

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, listopad 2019.

Sara Stoček

1066/N

**GENOTOKSIČNI UČINAK  $\Delta^9$ -  
TETRAHIDROKANABINOLA  
(THC) NA LJUDSKE TUMORSKE  
STANICE JEZIKA, JETRE I  
CRIJEVA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo.

Želim zahvaliti svojoj mentorici, profesorici Kseniji Durgo, na svoj pomoći, trudu i strpljenju tijekom izrade ovog rada. Također, hvala mojim roditeljima, sestri, bratu i prijateljima što su uvijek bili uz mene tijekom svih uspona i padova tijekom mog studiranja.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Nutricionizam

## GENOTOKSIČNI UČINAK $\Delta^9$ -TETRAHIDROKANABINOLA (THC) NA LJUDSKE TUMORSKE STANICE JEZIKA, JETRE I CRIJEVA

*Sara Stoček, 1066/N*

**Sažetak:** Kolorektalni karcinom najčešći je uzrok smrti nakon bolesti srca i krvožilnog sustava, a podjednako zahvaća muškarce i žene. Liječenje kolorektalnog karcinoma uključuje kirurško liječenje te primjenu kemoterapije i zračenja. THC je glavna aktivna komponenta biljke *Cannabis sativa*, a u zadnje se vrijeme sve više koristi kao suportivna terapija kemoterapiji. Cilj ovog rada je istražiti citotoksičan, prooksidativan i genotoksičan učinak THC-a. Kao test sustavi korištene su humane stanične linije epitelnih stanica karcinoma jezika (Cal 27), hepatocelularnog karcinoma jetre (Hep G2) i adenokarcinoma epitela debelog crijeva (Caco-2). Stanice su bile izložene djelovanju THC-a tijekom 2 – 48 sati, u rasponu koncentracija  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Dokazano je da THC djeluje citotoksično ovisno o duljini tretmana stanica i primjenjenoj koncentraciji. Prooksidativan je učinak povezan s citotoksičnošću. Na genotoksičan učinak su najotpornije stanice Caco-2, a Cal 27 i Hep G2 pokazuju jasnu ovisnost genotoksičnog učinka THC-a o produljenju vremena inkubacije i povećanju koncentracije.

**Ključne riječi:** *THC, citotoksičnost, indukcija slobodnih radikala, genotoksičnost, stanične linije, Cal 27, Hep G2, Caco-2, in vitro testovi*

**Rad sadrži:** 78 stranica, 30 slika, 123 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof. dr. sc. Ksenija Durgo*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Draženka Komes*
2. Prof.dr.sc. *Ksenija Durgo*
3. Dr.sc. *Irena Brčić Karačonji*, viši znan. sur.
4. Prof.dr.sc. *Blaženka Kos*

**Datum obrane:** 30. listopad 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

### GENOTOXIC EFFECT OF $\Delta^9$ -TETRAHYDROCANNABINOL (THC) ON HUMAN ORAL, LIVER AND COLON TUMOR CELLS

*Sara Stoček, 1066/N*

**Abstract:** Colorectal cancer is the most common cause of death, after cardiovascular diseases which affects both men and women equally. Colorectal cancer treatment involves a surgical operation with use of chemotherapy and radiation. THC is the major active compound of Cannabis sativa plant which has been increasingly used as a support for chemotherapy. The aim of this study is to determine cytotoxic, pro-oxidative and genotoxic effects of THC. Human cell lines of oral epithelial carcinoma cells (Cal 27), hepatocellular liver carcinoma cells (Hep G2) and colon epithelial adenocarcinoma cells (Caco-2) were used as test systems. Cells were exposed to THC 2 – 48 hours, in concentration range from  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ . It has been shown that cytotoxicity of THC depends on the duration of cell treatments and concentration used. Pro-oxidative effect was related with cytotoxicity. Caco-2 cells are most resistant to genotoxicity, and Cal 27 and Hep G2 cells show a clear connection of genotoxic effect of THC with the prolonging of incubation time and concentration used.

**Keywords:** *THC, cytotoxicity, induction of free radicals, genotoxicity, Cal 27, Hep G2, Caco-2, cell lines, in vitro assays*

**Thesis contains:** 78 pages, 30 figures, 123 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Ksenija Durgo, Full Professor*

#### Reviewers:

1. PhD. *Draženka Komes*, Full professor
2. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor
3. PhD. *Irena Brčić Karačonji*, Senior Scientific Associate
4. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor

**Thesis defended:** 30<sup>th</sup> October 2019

## SADŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
2.1. KARCINOGENEZA	2
2.1.1. Stanični ciklus	2
2.1.2. Stanična smrt	4
2.1.3. Mutacije onkogeni i tumor-surpresor gena	5
2.1.4. Oksidacijski stres	6
2.2. RAK DEBELOG CRIJEVA	6
2.2.1. Rizični faktori	7
2.2.2. Razvoj raka debelog crijeva	8
2.3. LIJEČENJE KARCINOMA	9
2.4. KONOPLJA ( <i>CANNABIS SATIVA</i> L.)	10
2.4.1. Kanabinoidi	11
2.4.2. Kanabinoidni receptori	12
2.4.3. Upotreba konoplje i THC-a	13
2.5. ADME THC-a	13
2.5.1. Apsorpcija	14
2.5.2. Distribucija	15
2.5.3. Metabolizam	16
2.5.4. Eliminacija	17
2.6. UČINCI KANABISA I THC-a	18
2.6.1. Negativni učinci THC-a	19
2.6.2. Učinak THC-a u borbi protiv karcinoma	19
2.7. <i>IN VITRO</i> ISPITIVANJA NA STANIČNIM KULTURAMA	20
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>22</b>
3.1. MATERIJALI	22
3.1.1. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnog učinka	22
3.1.2. Tetrahidrokanabinol (THC)	25
3.1.3. Kemikalije	26
3.1.4. Priprema otopina korištenih u eksperimentima	26
3.1.5. Laboratorijska oprema	28
3.2. METODE	29

3.2.1. Nasađivanje i kultivacija staničnih linija Cal 27, Hep G2 i Caco-2 u monosloju .....	29
3.2.2. Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra.....	30
3.2.3. Određivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija THC-a na staničnim linijama Cal 27, Hep G2 i Caco-2.....	31
3.2.4. Određivanje prooksidativnog učinka različitih koncentracija THC-a na staničnim linijama CAL 27, Hep G2 i Caco-2 DCF-DA testom .....	32
3.2.5. Određivanje oštećenja DNK komet testom izazvanih različitim koncentracijama THC-a na staničnim linijama Cal 27, Hep G2 i Caco-2.....	33
3.2.6. Statistička obrada podataka.....	36
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>37</b>
4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG UČINKA THC-a .....	37
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>67</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>68</b>



# 1. UVOD

U Hrvatskoj se, kao i u svijetu, bilježi porast učestalosti i smrtnosti od raka debelog crijeva (Bergman Marković, 2015). Otprilike 25 % novo dijagnosticiranih osoba već ima razvijene metastaze, a u 50 % oboljelih od raka debelog crijeva doći će do metastaziranja raka tijekom progresije bolesti (Juretić i sur., 2017).

Proces razvitka karcinoma naziva se karcinogeneza, a karakterizira je nekontrolirana dioba stanica i njihovo svojstvo širenja. Epitel debelog crijeva pogodan je za mutacije i karcinogenezu. Stanice epitelnog tkiva debelog crijeva imaju visoku stopu replikacije, a uz lumen debelog crijeva često su prisutni nekancerogeni polipi čiji se broj povećava starenjem (Harrison, 2001; Muto i sur., 1975). Progresija tumora zbiva se postupno, u koracima od hiperplastičnog epitela do razvitka adenoma, karcinoma te naposljetku metastaza (Pandurangan i sur., 2018).

Ranijim otkrivanjem raka postižu se bolji rezultati liječenja. Samo liječenje raka debelog crijeva je multidisciplinarno. Nakon primarnog kirurškog liječenja primjenjuje se terapija citostaticima (kemoterapija) ili kombinacija kemoterapije i zračenja (Roth i Roth, 2001; Juretić i sur., 2017).

Biljka *Cannabis sativa* u zadnje se vrijeme sve češće upotrebljava u medicinske svrhe. Aktivne komponente biljke *C. sativa* su kanabinoidi, a primarna psihoaktivna komponenta je THC ( $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol) (Huestis, 2007). Kanabinoidi, pa tako i THC, svoje fiziološke učinke postižu interakcijom sa specifičnim kanabinoidnim receptorima, CB1 i CB2 (Klumpers i Thacker, 2019).

THC se najčešće unosi inhalacijom ili oralnim putem (Bruni i sur., 2018), što utječe na njegovu biodostupnost i daljnju farmakokinetiku, odnosno distribuciju, metabolizam enzimima jetre i drugih organa te eliminaciju fecesom, urinom, znojem i kosom (Huestis, 2007).

Rezultati ovog istraživanja pokazat će ovisnost genotoksičnog djelovanja THC-a na različite humane stanične linije o vremenu izloženosti stanica i različitim koncentracijama ovog spoja. Također, dokazat će se da THC u *in vitro* sustavima inducira slobodne radikale koji doprinose citotoksičnom i genotoksičnom učinku.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. KARCINOGENEZA**

Rak je bolest koju karakterizira nekontrolirana dioba stanica te njihovo svojstvo širenja. Takav rast stanica naziva se karcinogeneza, a uzrokovan je oštećenjima na deoksiribonukleinskoj kiselini (DNK) koje rezultiraju mutacijama, promjenama staničnog ciklusa i apoptozom što dovodi do razvitka tumora (Sarfaraz i sur., 2008). Razlikujemo različite vrste raka, poput karcinoma, sarkoma, leukemije, limfoma i mijeloma, itd. Karcinom predstavlja rak nastao iz epitelnih stanica. Karcinogeneza se zbiva na molekularnoj razini uslijed oštećenja gena uzrokovanih vanjskim faktorima (alkilirajući agensi, dim cigarete, UV zrake) te spontanim mutacijama u organizmu (Shewach i Kuchta, 2009).

Razvoj malignog tumora sastoji se od: inicijacije, promocije i progresije odnosno metastaziranja. Inicijacija predstavlja ireverzibilni proces tijekom kojega se stvaraju klonovi maligno transformiranih stanica, a ona podrazumijeva izloženost normalnih stanica kemijskim ili fizikalnim kancerogenima koji oštećuju DNK i ostale stanične molekule. Veliki broj točkastih mutacija, translokacija, amplifikacija i delecija posljedično dovodi do razvoja karcinoma, a same mutacije mogu izrazito varirati i unutar histopatološki identičkih tumora (Cairns i sur., 2011). Promocija je reverzibilni proces u kojemu ulogu imaju karcinogeni čimbenici i čimbenici koji dovode do inicijacije. Stanice s izmijenjenim metaboličkim putevima šire se tkivima te uzrokuju dodatna oštećenja genetskog materijala stanica (Loeb i Harris, 2008). Tijekom ireverzibilnog procesa progresije dolazi do uočljivih promjena genoma i stvaranja tumora. Širenje malignih stanica organizmom naziva se metastaziranje (Štraus, 1995). Od trenutka izloženosti stanice karcinogenu do razvoja i detekcije tumora može proći čak 20 – 50 godina (Sarfaraz i sur., 2008).

#### **2.1.1. Stanični ciklus**

Rast i diferencijacija stanica pod kontrolom su pozitivne i negativne regulacije. Njome je uvjetovano hoće li neka stanica proliferirati i nastaviti se diferencirati ili će doći do apoptoze, tj. stanične smrti (Štraus, 1995). Za prijenos signala od stanične membrane do jezgre, odnosno do DNK odgovorna je unutarstanična komunikacija. Tijekom staničnog ciklusa DNK se replicira tijekom S-faze te tijekom M-faze nastanu dvije identične stanice kćeri (Sherr, 1996).

Stanični ciklus svih eukariotskih stanica sastoji se od četiri precizno regulirane faze: G1, S, G2 i M. Prijelaz iz jedne faze u drugu ograničavaju kontrolne točke (Abukhdeir i Park, 2008). Tijekom G1 faze (eng. *gap* = praznina, međuprostor, G) stanica se priprema za sintezu DNK, a zbog utjecaja mitogena i faktora rasta metabolički je izrazito aktivna. Tijekom G1 faze stanica raste te se sintetiziraju enzimi potrebni za S fazu. Slijedi S faza (eng. *synthesis* = sinteza, spajanje, S) tijekom koje dolazi do replikacije DNK i duplikacije centrosoma. U G2 fazi stanica opet ubrzano raste, kromosomi u jezgri postaju sve vidljiviji i sintetiziraju se proteini potrebni za mitozu. Tijekom mitoze (eng. *mitosis* = mitoz, M faza) sestrinske se kromatide dijele na dva kromosoma. Odmah potom slijedi citokineza tijekom koje se dijele jezgra, citoplazma, organeli i plazmatska membrana te nastaju dvije identične stanice kćeri (Abukhdeir i Park, 2008). Tijekom G0 faze (faze mirovanja) stanice su metabolički aktivne, međutim do proliferacije će doći tek kada ih na to potaknu pozitivni signali (Cooper i Hausman, 2004).

G-proteini imaju važnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. GTP vezujući proteini, odnosno G-proteini, heterotrimeri su sastavljeni od  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  podjedinica te podjedinica vezanih za plazmatsku membranu. Inaktivan G-protein vezan je za receptor, a na  $\alpha$ -podjedinicu, koja ima GTP-aznu aktivnost, vezan je GDP. Uslijed vezanja liganda za receptor, sa  $\alpha$ -podjedinice se otpušta GDP i na to se mjesto veže GTP te aktivna  $\alpha$ -podjedinica disocira sa  $\beta$ - i  $\gamma$ -podjedinica i veže se za adenilil-ciklazu koja se time aktivira. Posljedično dolazi do povećanja koncentracije cAMP-a, koji je mitogen. Zbog GTP-azne aktivnosti  $\alpha$ -podjedinice, GTP disocira u GDP te ponovo dolazi do povezivanja podjedinica u heterotrimer. Kod tumora hipofize, ustanovljeno je da dolazi do točkastih mutacija G-proteina kojima dolazi do smanjene učinkovitosti GTP-aze  $\alpha$ -podjedinica. Iz tog razloga ona ostaje dulje vezana za adenilil-ciklazu, stvara se više cAMP-a te se stanice dulje potiču na mitotičko dijeljenje (Štraus, 1995).

DNK predstavlja genetički materijal koji se vjerno kopira prilikom svake stanične diobe, međutim ona je također pogodna za direktne modifikacije X-zrakama, alkilirajućim agensima te utjecaju kemikalija iz okoliša (Loeb i Harris, 2008).

Napredovanje kroz stanični ciklus pod kontrolom je regulatornih proteina – ciklina. Tranzicije između faza omogućuje vezanje ciklina za određenu obitelj kinaza, ciklin ovisnih protein kinaza (Cdk). U kontrolu proliferacije stanica također su uključeni fosfoproteini koji ograničavaju proliferativni vijek stanica. Kod tumora dolazi do alteracija ovih proteina i njihove ekspresije što se očituje promjenama u telomeraznoj aktivnosti ili nepravilne metilacije promotorske regije gena (Seregni i sur., 2001).

Rak se može smatrati bolešću staničnog ciklusa zato što normalne stanice proliferiraju kao odgovor na stimulanse rasta i specifične mitogene signale, dok stanice raka proliferiraju nereguliranim načinom (Diaz-Moralli i sur., 2013).

### 2.1.2. Stanična smrt

Postoji nekoliko tipova stanične smrti: apoptoza (fiziološka, prirodna ili programirana smrt stanica), nekroza (slučajna, sporedna ili toksična smrt stanica) te autofagija. Pokretači stanične smrti su različiti, poput oksidativnog stresa, hipoksije, inhibicije sinteze proteina, virusne infekcije, lučenja TNF-a (porodica faktora nekroze tumora) te reaktivni kisikovi spojevi (eng. *reactive oxygen species*, ROS) (Janković i Markotić, 2007).

Apoptoza je fiziološki oblik stanične smrti u ravnoteži sa staničnom proliferacijom te utječe na održavanje konstantnog broja stanica u tijelu. Apoptoza ima bitnu ulogu u embrionalnom razvoju te u održavanju odraslih tkiva, a služi kao obrambeni mehanizam kojim se potencijalno opasne i oštećene stanice uklanjanju iz organizma (Cooper, 2002). Apoptozu aktiviraju različiti posrednici koji uzrokuju pokretanje kaskade proteolitičkih enzima, kaspaza te specifičnih morfoloških i biokemijskih promjena poput skupljanja stanica, kondenzacije kromatina, fragmentacije DNK i formiranja apoptotskih tjelešaca koja se spajaju s makrofagima i tako razgrađuju stanicu. Na taj se način, uz utrošak energije, izbjegava aktivacija imunskog sustava (Žlender, 2003; Edinger i Thompson, 2004). Tumorske stanice imaju sposobnost izbjegavanja i inhibicije mehanizama apoptoze čime se omogućuje njihovo preživljavanje i proces metastaziranja (Bates i Lewis, 2013, Thurston, 2007)

Nekroza se smatra pasivnim oblikom stanične smrti, a javlja se zbog bioenergetskog disbalansa, tj. nedovoljnog broja molekula ATP-a u stanici. Do nekroze dolazi uslijed letalnih patoloških oštećenja stanica, promjena oblika i funkcije mitohondrija te nesposobnosti održavanja stanične homeostaze. Nekrozu mogu uzrokovati i ozljede, upale, tumori i djelovanje otrova. Stanica koja je jako oštećena ne može kontrolirati ravnotežu tekućine i iona te izmjenu tvari, te dolazi do bubrenja stanica, gubitka cjelovitosti staničnih organela i propuštanja membrane. Stanični sadržaj se raspada i istječe čime se okolno tkivo nadražuje uslijed oslobađanja medijatora upale, a time dolazi do širenja upalnog procesa na ostale stanice (Haghiac i Walle, 2005; Savill, 1994).

Autofagija se javlja u uvjetima metaboličkog stresa poput gladovanja ili energetskog kolapsa u obliku kataboličkog procesa (Fulda i sur., 2010). Uslijed autofagije dolazi do gubitka staničnih proteina, neophodnih za normalno funkcioniranje stanice te u konačnici do stanične

smrti uslijed nedostatka hranjivih tvari (Edinger i Thompson, 2004). U ranim fazama metastaziranja raka autofagija smanjuje infiltraciju upalnih stanica i nekrozu tumorskih stanica čime se smanjuje invazija stanica i metastaza. Međutim, autofagija može djelovati i kao promotor metastaza u uznapredovalim fazama raka, poticanjem preživljenja stanica i metastaza (Pandurangan i sur., 2018).

Pri povoljnim staničnim uvjetima dolazi do spontanijih endogenih promjena genomske DNK u obliku hidroliza, oksidacija i elektrofilnih napada. Te reakcije mogu biti posljedica izloženosti egzogenim uzrocima ili kemikalijama, ali također mogu biti izazvane endogenim metaboličkim procesima (Boyer i Levin, 2008). Egzogeni agensi mogu dovesti do jednolančanih lomova DNK (eng. *single strand breaks*, SSB), dvolančanih lomova DNK (eng. *double strand breaks*, DSB), može doći do formiranja kovalentnih mostova između komplementarnih lanaca i nastanka modificiranih baza. Egzogeni agensi koji dovode do oštećenja DNK su fizikalni karcinogeni (ionizirajuće zračenje, UV zračenje,  $\gamma$ -zračenje), kemijski karcinogeni (azbest, aflatoksin, benzen,...) te biološki karcinogeni (virusne, bakterijske ili parazitske upale) (Loeb i Harris, 2008).

### 2.1.3. Mutacije onkogeni i tumor-supresor gena

Mutacije odgovorne za nastanak tumora javljaju se u tri skupine gena: onkogenima, tumor-supresor genima te genima za provjeru i popravak DNK (Cooper, 2002). Geni koji uzrokuju malignu transformaciju stanica nazivaju se onkogeni. Oni mijenjaju normalne stanične poruke i procese koji reguliraju ulazak stanice u G fazu staničnog ciklusa. Zbog toga dolazi do prekomjerne ili neprikladne ekspresije genetskog materijala, nekontroliranog rasta i diobe stanica te naposljetku do tvorbe tumora (Štraus, 1995). Proto-onkogeni imaju mutacijsku aktivnost i na taj način uzrokuju karcinogenezu, dok tumor supresor geni osiguravaju negativnu regulaciju staničnog ciklusa, tj. oni sprječavaju prijelaz staničnog ciklusa iz G faze u S fazu i na taj način zaustavljaju proliferaciju stanica (Pećina-Šlaus i sur., 2005).

Gen p53 bitan je tumor supresor, ali on je također jedan od najčešće mutiranih gena tijekom formacije karcinoma u ljudi. Oštećenjem gena p53 i promjenom njegove signalizacije u raku debelog crijeva, dolazi do gubitka apoptoze i kontrolnih točaka staničnog ciklusa te izmjena genetičkog integriteta što rezultira malignosti i razvojem tumora (Pandurangan i sur., 2018).

#### 2.1.4. Oksidacijski stres

ROS (reaktivni kisikovi spojevi) je zajednički naziv za radikale kisika te neradikalne derivate kisika koji su oksidirajući agensi i/ili se lako prevode u radikale (Buonocore i sur., 2010). Oni doprinose normalnoj fiziološkoj funkciji stanica poput stanične diferencijacije, signalizacije, apoptoze i baktericidnog djelovanja. Međutim, oksidacijski stres uzrokuje lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina i oštećenja DNK, što uzrokuje gubitak fluidnosti staničnih membrana, inaktivaciju membranskih enzima, ubrzanje proteolize, poremećaje stanične signalizacije, maligne procese i smrt stanice (Rossman i sur., 2013). Stupanj oštećenja stanica uzrokovan oksidacijskim stresom ovisi o duljini trajanja i stupnju oksidacijskog stresa te mehanizmu kojim je izazvan (Lee i sur., 2012). Uloga ROS u kancerogenezi još uvijek nije potpuno razjašnjena, ali poznato je da dugotrajan i prekomjeran oksidacijski stres ima ulogu u inicijaciji proliferacije tumorskih stanica (Valko i sur., 2004).

## 2.2. RAK DEBELOG CRIJEVA

Debelo crijevo (lat. *intestinum crassum*) dio je probavne cijevi smješteno u trbušnoj šupljini. Nastavlja se na tanko crijevo, a sastoji se od debelog i završnog crijeva koje završava analnim kanalom (Gilroy i sur., 2011). Tijekom probave, u probavnoj se cijevi hrana kemijski razgrađuje pri čemu dolazi do resorpcije nutrijenata te vode i elektrolita u debelom crijevu, a neprobavljeni se ostatak izbacuje izmetom (Bajek i sur., 2007).

Prema podacima Registra za rak Republike Hrvatske Zavoda za javno zdravstvo, rak debelog crijeva vrlo je učestao unutar hrvatske populacije, zahvaćajući podjednako muškarce i žene (Juretić i sur., 2017). Nakon bolesti srca i krvožilnog sustava, najčešći je uzrok smrti. Vrdoljak i sur. (2018) zaključili su da stopa incidencije raka debelog crijeva u Hrvatskoj iznosi 72,2 na 100.000 stanovnika godišnje ( $M = 90,5$  i  $\bar{Z} = 55,2$ ). Rak kolona, rektuma, rektosigme i anusa zajedno se pojavljuju u 16 % muškaraca i 14 % žena. Prema mortalitetu, među muškarcima je prvi, a među ženama je na trećem mjestu, iza karcinoma dojke i pluća (Šekerija, 2019). Visok stupanj smrtnosti rezultat je kasnog otkrivanja karcinoma. Naime, u Hrvatskoj je svega 10 % kolorektalnih karcinoma dijagnosticirano u trenutku kad je on lokaliziran samo na stijenci crijeva, a s većom proširenošću raka stopa preživljenja opada (Bergman Marković, 2015). Rizik od pojave kolorektalnog karcinoma raste s godinama, a osobito velik porast rizika je nakon 50. godine života (Štimac, 2008).

### 2.2.1. Rizični faktori

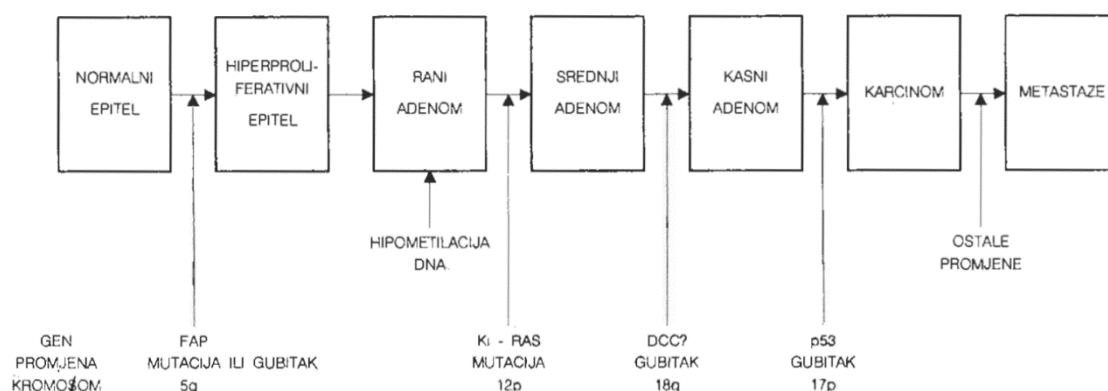
Rizični faktori koji doprinose riziku za nastanak karcinoma debelog crijeva dobro su opisani, međutim, u čak 75 % slučajeva bolest se javlja bez utvrđenog faktora rizika, a pritom važnu ulogu imaju vanjski činitelji i nasljedni faktori (Brkić i Grgić, 2006).

Epitel debelog crijeva pogodan je za mutacije i karcinogenezu zbog visoke stope replikacije stanica. Uz lumen debelog crijeva često su prisutni benigni (nekarcinogeni) polipi, a njihov se broj povećava starenjem (Harrison, 2001; Muto i sur., 1975). Razlikujemo 3 vrste polipa: hiperplastični, adenomatozni i maligni polipi. Što su polipi veći, to imaju veću šansu razvitka u adenom i tvorbe tumora. Hiperplastični polipi uglavnom su nekarcinogeni, a upalni polipi prisutni su kod osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva – ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti te stoga oboljeli imaju veći rizik za razvitak karcinoma debelog crijeva (Pandurangan i sur., 2018). Rak debelog crijeva razvija se nekontroliranom proliferacijom epitelnog tkiva sluznice debelog crijeva i razvojem adenoma koji su pronađeni u 45 % slučajeva raka kod osoba starijih od 60 godina. Adenomi veći od 1 cm nakon 10 godina prijeći će u karcinom, s vjerojatnošću od 15 % (Roth i Roth, 2001).

Rizični faktori za nastanak kolorektalnog karcinoma (raka debelog crijeva, odnosno CRC-a) su mnogobrojni, poput mutagena prisutnih u fecesu, unosa veće količine crvenog mesa, masne hrane i alkohola, povišene žučne kiseline i pH stolice te sjedilački način života (Pandurangan i sur., 2018; Magalhães i sur., 2012). Žučne kiseline, koje su prisutne u crijevima osobito nakon konzumiranja masne hrane, uzrokuju hiperproliferaciju sluznice crijeva. Povišeni pH stolice pogoduje većoj koncentraciji žučnih kiselina i drugih potencijalnih kancerogena. Genetički čimbenici izuzetno su važni, čemu u prilog govori i činjenica da oko 25 % oboljelih ima pozitivnu obiteljsku anamnezu. Mutageni prisutni u fecesu, poput fekaptena, 3-ketosteroidea i heterocikličkih amina, prisutni su u puno manjim koncentracijama u stolici osoba koje svakodnevno unose hranu bogatu vlaknima. Vlakna ubrzavaju pražnjenje crijeva te na taj način smanjuju vrijeme kontakta mutagena sa sluznicom debelog crijeva. Smanjenju rizika od nastanka raka debelog crijeva također pogoduje dostatan unos kalcija te antioksidansi – selen i vitamini A, C, E i D. Nadoknadna hormonska terapija tijekom menopauze i uzimanje nekih nesteroidnih protuupalnih lijekova također djeluju zaštitno (Roth i Roth, 2001; Brkić i Grgić, 2006).

### 2.2.2. Razvoj raka debelog crijeva

Progresija tumora zbiva se u postupnim koracima, od hiperplastičnog epitela do adenoma, pa karcinoma i naposljetku metastaza, što je prikazano slikom 1. U razvitku CRC-a iz benignih polipa preko adenoma uključeni su različiti signalni putevi koji reguliraju staničnu proliferaciju i diferencijaciju, a značajnu ulogu ima disregulacija signalnog puta stanične smrti. (Pandurangan i sur., 2018). Za razvoj raka odgovorno je nekoliko gena. Za inicijalne su promjene mukoze kolona odgovorni APC ili  $\beta$ -katenin. Tijekom napredovanja tumorskih stanica i formacije karcinoma, dolazi do uzastopnih mutacija i preuređenja genomskog materijala gena povezanih s rakom: mutacija u 5q kromosomu, hipometilacija DNK zbog nestabilnosti adenoma, aktivacije k-ras, gubitka heterozigotnosti na kromosomu 18q te u konačnici do tvorbe karcinoma i metastaza (Loeb i Harris, 2008; Pandurangan i sur., 2018).



**Slika 1.** Prikaz koraka tijekom razvoja kolorektalnog karcinoma (Štraus, 1995)

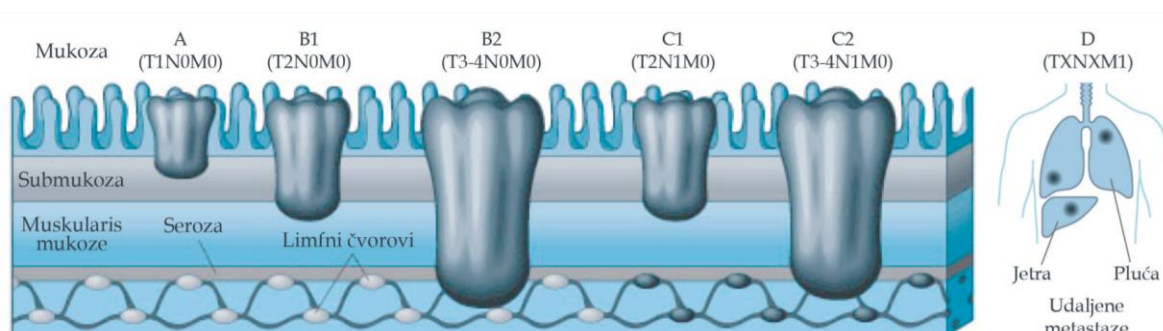
Stvaranje adenoma posljedica je mutacija gena APC lociranog na kromosomu 5q čime dolazi do konstantne aktivacije signala posredovanog  $\beta$ -kateninom i proliferacije tumora. Mutacije gena k-ras javljaju se u ranim stadijima CRC-a, a povezane su s dubinom invazije i prognozom bolesti. Jedna od posljednjih mutacija prije razvoja karcinoma je mutacija tumor supresor gena TP53 smještenog na kromosomu 17p. Genom TP53 stvara se fosfoprotein p53, koji se naziva čuvarom genoma jer on zaustavlja stanični ciklus u slučaju oštećenja DNK i inducira apoptozu ako se oštećenja DNK ne mogu uspješno popraviti. Stanice će biti zaustavljene u G1 fazi sve dok se ne obnovi stanje stanica prije stresa. Tumorske stanice koje sadrže mutacije gena TP53 imaju genomsku nestabilnost i smanjenu mogućnost apoptoze (Seregini i sur., 2001). Do oštećenja gena TP53 i gubitka p53 dolazi u 70 % kolorektalnih



karcinoma, a smatra se da je glavni uzrok prijelaza adenoma u karcinom zakazivanje mehanizama apoptoze (Pandurangan i sur., 2018).

### 2.3. LIJEČENJE KARCINOMA

Ranijim otkivanjem raka, odnosno u trenutku prekancerogenih promjena – adenomatoznih polipa, postižu se bolji rezultati liječenja. Rizik od pojave adenoma u cijeloj je populaciji oko 20 %, a pokazalo se da se u 2 % do 5 % osoba razvije karcinom. Napredovanjem bolesti javljaju se metastaze, koje su najčešći razlog bolesnika za traženjem pomoći. Dijagnostičke metode dokazivanja kolorektalnog karcinoma u osoba koje pate od kolorektalnog krvarenja, sideropenične anemije te znakova opstrukcije ili promjena načina pražnjenja stolice, uključuju: digitorektalni pregled, rektostimoskopiju te kolonoskopiju ili irigografiju. Najbolji uvid u promjene na debelom crijevu dobiva se kolonoskopijom, gdje je istodobno moguće odstraniti polipe ili barem uzeti uzorak za histološku analizu (Roth i Roth, 2001).



**Slika 2.** Klasifikacija kolorektalnog karcinoma ovisno o stupnju proširenosti (Brkić i Grgić, 2006)

Stadij karcinoma određuje se TNM klasifikacijom iz 2009. godine. Slovo „T“ označava veličinu primarnog tumora, „N“ se odnosi na zahvaćenost okolnih limfnih čvorova, a „M“ daje podatak o prisutnosti metastaza karcinoma (Compton i Greene, 2004; AJCC, 2010). Ovaj se tip karcinoma širi lokalnom invazijom te limfnim, hematogenim, transperitonealnim i perineuralnim putem. Najčešće mjesto ekstralimfatičnog širenja tumora je jetra, a nakon nje slijede pluća, kosti, bubrezi te nadbubrežne žlijezde i mozak (Brkić i Grgić, 2006; Nelson i sur., 2001). Adekvatna terapija uključuje uklanjanje primarne tumorske lezije te svih regionalnih limfnih čvorova i drenažnih puteva pa je stoga liječenje uspješnije što je bolest u ranijem stadiju (Roth i Roth, 2001).

Samo liječenje kolorektalnog karcinoma je multidisciplinarno te se u velikog broja oboljelih nakon kirurškog liječenja primjenjuje kemoterapija ili kombinacija kemoterapije i zračenja. Radikalna kirurška terapija oboljeloj osobi pruža najveću mogućnost izlječenja, a adekvatna kemoterapija i zračenje povećavaju postotak preživljenja (Roth i Roth, 2001; Juretić i sur., 2017). Lijekovi koji se upotrebljavaju u kemoterapiji nazivaju se citostatici. Oni potiču apoptozu stanica debelog crijeva u svrhu kontrole progresije karcinoma. Osim toksičnog učinka, citostatici često imaju karcinogeni, mutageni i teratogeni potencijal, a pokazali su se vrlo korisnim prilikom liječenja metastaziranog raka debelog crijeva. Najčešće se koriste fluoropirimidini, poput 5-fluorouracila, u kombinaciji s irinotekanom i/ili oksaliplatinom i monoklonalnim antitijelima (Krešić, 2009).

## **2.4. KONOPLJA (*CANNABIS SATIVA* L.)**

*Cannabis sativa* (konoplja, tj. kanabis) dvodomna je biljka koja pripada obitelji Cannabaceae (Magnoliopsida, Urticales). Već 4000 godina prije Krista bila su poznata njena psihoaktivna i medicinska svojstva (Bruni i sur., 2018), a zbog zabrane njene upotrebe, već krajem 1970-ih neke su tvrtke počele razvijati sintetske kanabinoide za kliničku upotrebu (Quintas, 2019). U biljci se sintetizira više od 100 kanabinoida, a sekundarnim metabolizmom nastaje još oko 400 spojeva koji također pridonose ljekovitom učinku kanabisa (Abrams i Guzman, 2015). Kao rezultat mnogogodišnjeg križanja i selekcije, danas razlikujemo više od 700 sorti kanabisa s različitim sadržajem kanabinoida i terpena (Klumpers i Thacker, 2019). Genom, ali i vanjski uvjeti u kojima biljka raste, poput klime, značajno utječu na sastav kanabinoida (Turner i sur., 2017).  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol, odnosno THC, primarna je psihoaktivna komponenta kanabisa, a prvi put izolirali su ga, 1964. godine, Gaoni i Machoulam. Osim kanabinoida, poznato je 18 različitih vrsta spojeva, uključujući nitrogene spojeve, aminokiseline, ugljikovodike, ugljikohidrate, terpene i jednostavne masne kiseline koji pridonose poznatim farmakološkim i toksikološkim svojstvima kanabisa (Huestis, 2007). Kanabinoidi su glavni biološki aktivni spojevi kanabisa, lipidnog sastava s niskom topljivosti u vodi (Grotenhermen, 2003; Bruni i sur., 2018), a terpeni su nestabilni spojevi koji daju miris biljkama (Klumpers i Thacker, 2019).

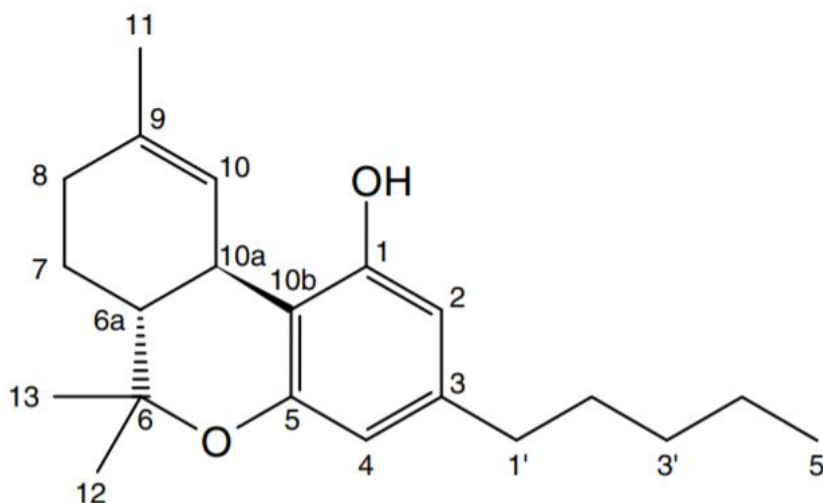
U zadnje se vrijeme biljka *Cannabis sativa* sve češće upotrebljava u medicinske svrhe, a dokazi o povoljnim učincima kanabinoida na stanja poput boli, epilepsije, poremećaja spavanja, anoreksije i simptoma multiple skleroze rastu iz dana u dan (Bruni i sur., 2018).

#### 2.4.1. Kanabinoidi

Kanabinoidi su kemijski spojevi terpenofenolne strukture, sastavljeni od 21 ugljikovog atoma, a prirodno su prisutni u biljci kanabisa (Abrams i Guzman, 2015). Razlikujemo tri vrste kanabinoida: prirodne, endogene i sintetske kanabinoide. Prirodni kanabinoidi poput  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola (THC) i kanabidiola (CBD) sintetiziraju se u biljci kanabisa. Endogeni kanabinoidi odnosno endokanabinoidi prirodno su prisutni u stanicama mozga i tijelu ljudi (Hall i sur., 2005), a to su anandamid i 2-arahidonoil glicerol. Sintetski su kanabinoidi proizvedeni u laboratorijima, a svojom strukturom nalikuju prirodnim ili endogenim kanabinoidima. Neki od sintetskih kanabinoida su WIN-55, 212-2, JWH-133 i (R)-metanandamid (MET) (Sarfaraz i sur., 2008).

Kanabinoidi su osjetljivi na svjetlo i temperaturu te lako degradiraju auto-oksidacijom (Pacifi i sur., 2018). Ova svojstva kanabinoida značajna su u kreiranju lijekova i njihovoj stabilnosti. U proizvodima na tržištu nalaze se različiti oblici kanabinoida s povećanom stabilnošću, poput soli, miceliziranog i inkapsuliranog oblika te u formulaciji na lipidnoj bazi (Oh i sur., 2017).

THC (prikazan slikom 3) se nalazi u smoli koja prekriva cvjetove i listove ženske biljke. Najviše su koncentracije THC-a prisutne u vršcima cvjetova (Hall i sur., 2005). THC je obično prisutan u biljnom materijalu kanabisa kao mješavina monokarboksilnih kiselina koje se brzo i učinkovito dekarboksiliraju prilikom zagrijavanja. Raspada se kada je izložen zraku, toplini ili svjetlu. Također, sušenjem biljke na suncu oslobađaju se različite količine THC-a dekarboksilacijom te se u konačnici udjeli THC-a u biljkama razlikuju (Huestis, 2007).



**Slika 3.** Molekula  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinola (THC-a) (Grotenhermen, 2003)

#### 2.4.2. Kanabinoidni receptori

Kanabinoidi postižu svoje fiziološke učinke interakcijom sa specifičnim kanabinoidnim receptorima, CB receptorima, koji se nalaze u mozgu i perifernim tkivima (Klumpers i Thacker, 2019). Njihovi fiziološki ligandi su anandamidi, derivati arahidonske kiseline, a uobičajeno moduliraju aktivnost neurona djelovanjem na dinamiku c-AMP-a i transport  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{K}^+$  iona (Sharma i sur., 2012). Kanabinoidni receptori, CB1 i CB2, pripadaju obitelji transmembranskih G-proteina. Izuzeto su važan endogeni put lipidne signalizacije, također nazvan i „Endokanabinoidni sustav“ koji se sastoji od kanabinoidnih receptora, endogenih liganda (endokanabinoida) i enzima koji reguliraju biosintezu i inaktivaciju endokanabinoida. Endokanabinoidni je sustav uključen u razne fiziološke funkcije centralnog i perifernog živčanog sustava te endokrinog i imunostava (Bruni i sur., 2018).

Najveća koncentracija receptora CB1 nalazi se u bazalnim ganglijima, hipokampusu, cerebellumu i cerebralnom korteksu mozga, međutim prisutan je i u drugim tkivima organizma, poput adipoznog masnog tkiva, tiroidne žlijezde i jetre. Receptor CB2 identificiran je izvan mozga 1993. godine u makrofagima i marginalnoj zoni slezene, dok se u najvećoj koncentraciji nalazi na B limfocitima i stanicama prirodnim ubojicama što ukazuje na njegovu ulogu u imunostavu (Sarfaraz i sur., 2008).

THC djeluje prvenstveno kao agonist CB1 ( $K_i = 53 \text{ nM}$ ) i CB2 ( $K_i = 53 \text{ nM}$ ) receptora (Marzo i sur., 2004), a psihotropni učinci kanabisa uglavnom su posredovani CB1 receptorom, koji djeluje inhibitorno na adenilil ciklazu i kalcijeve kanale. Aktivacijom CB1 dolazi do inhibicije adenilat ciklaze i smanjenja razine cAMP-a. Slijedi kaskada reakcija koja rezultira

inhibicijom aktivnosti protein kinaze A (PKA) i aktivacijom kalijevih kanala čime dolazi do smanjenja stanične razine kalija (Bruni i sur., 2018; Abrams i Guzman, 2015).

#### 2.4.3. Upotreba konoplje i THC-a

Procjenjuje se da 188 milijuna ljudi na svjetskoj razini upotrebljava proizvode dobivene iz biljke *C. sativa*. Rekreativno, kanabis najčešće upotrebljavaju adolescenti i ljudi mlađe životne dobi i to pretežno zbog njegovih psihoaktivnih učinaka (UNODC, 2019). Upotreba kanabisa na području Europe niža je u odnosu na Australiju, Kanadu i SAD, a unutar Europe, najviša je razina upotrebe kanabisa uočena u Ujedinjenom Kraljevstvu, Francuskoj i Danskoj (Hall i sur., 2005).

Za terapijsku upotrebu testirani su različiti načini unosa THC-a i kanabisa, a najčešći oblik unosa je inhalacijom ili oralnim putem (Bruni i sur., 2018). Medicinski preparati od kanabisa legalni su u Austriji, Kanadi, Češkoj republici, Finskoj, Njemačkoj, Izraelu, Italiji, Portugalu, Španjolskoj i nekim državama SAD-a (Abrams i Guzman, 2015).

Marihuana se priprema iz osušenih cvjetnih vrhova i listova ženske biljke, a koncentracija THC-a u marihuani iznosi između 0,5 % i 5,0 %. Ulje konoplje se priprema ekstrakcijom THC-a marihuane u ulju, a sadrži između 15,0 % i 20,0 % THC-a (Hall i sur., 2005). Prije same berbe kanabisa, u biljci je niski udio aktivnog THC-a. Tijekom pušenja kanabisa dolazi do spontane dekarboksilacije karboksilnih kiselina i stvaranja THC-a, uslijed zagrijavanja (Huestis, 2007).

### 2.5. ADME THC-a

Na koncentraciju THC-a u krvotoku utječu faktori poput doze, načina primjene, sredstva i fizioloških faktora poput apsorpcije te stupnja metabolizma i izlučivanja. Farmakokinetika kanabinoida obuhvaća apsorpciju nakon različitih načina primjene i formulacija lijeka, njihovu distribuciju i metabolizam u jetri i ostalim organima te eliminaciju fecesom, urinom, znojem i kosom (Huestis, 2007). Brzina, snaga i tip djelovanja kanabisa razlikuje se ovisno o putu primjene. THC se nakon unosa brzo distribuira tijelom sve do masnih tkiva poput mozga, a metabolizira ga sustav enzima citokrom P450, do metabolita poput psihoaktivnog 11-hidroksi-THC-a (Klumpers i Thacker, 2019).

### 2.5.1. Apsorpcija

Apsorpcija ovisi o načinu unosa, a pod utjecajem je lipofilnosti proizvoda i individualnim razlikama u tkivima organa. Čimbenici poput prehrane, ukoliko se radi o oralnom unosu te jačine i dinamike udisaja ako se radi o inhalaciji, utječu na stupanj apsorpcije te ona varira od 20 % do 30 % za oralan unos i 5 % do 60 % za unos inhalacijom (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007; Ohlsson i sur., 1982).

#### 2.5.1.1. *Oralan unos*

Unos u obliku ulja i tableta omogućuje preciznije doziranje od sokova i čajeva pripremljenih iz sirove biljke. Međutim, apsorpcija je spora, nestabilna i promjenjiva, a metabolizmom nastaju psihoaktivni metaboliti. Maksimalne koncentracije THC-a u plazmi postižu se unutar 60 – 120 minuta, ali može trajati i duže (do 6 sati). Opsežan primarni hepatski metabolizam smanjuje oralnu bioraspoloživost THC-a, a trajanje učinka varira između 8 i 20 sati. Tijekom metabolizma stvaraju se brojni metaboliti, većinom u jetri, ali i u drugim tkivima poput srca i pluća (Bruni i sur., 2018; Grotenhermen, 2003). Metabolit 11-hidroksi-THC, koji nastaje u većim koncentracijama nakon oralnog unosa THC-a, djeluje potentnije od samog THC-a te vrlo brzo prelazi moždanu barijeru (Hall i sur., 2005). Kanabinoidi tijekom metabolizma mogu uzrokovati iritacije gastrointestinalnog sustava i zbog toga se razvijaju alternativni načini unosa, poput transdermalnog, nazalnog, oralnog transmukozalnog i inhalacijskog unosa plućima. Na taj je način omogućen unos lijeka direktno u krvotok čime se zaobilazi primarni metabolizam jetrom (Bruni i sur., 2018).

#### 2.5.1.2. *Unos inhalacijom*

Intrapulmonalnim unosom se THC vrlo brzo apsorbira i ulazi u krvotok (Hall i sur., 2005). Najviše koncentracije THC-a u krvotoku postižu se unutar prvih 10 minuta od inhalacije i ostaju stabilne tijekom 3 – 5 sati (Hartman i sur., 2015). Ovim načinom unosa izbjegava se prvotni hepatski metabolizam zato što THC iz pluća direktno ulazi u krvotok (Klumpers i Thacker, 2019). Ubrzo nakon unosa, THC se metabolizira u ne psihoaktivan metabolit 9-karboksi-THC (Hall i sur., 2005). Glavno ograničenje ovakvog unosa je varijabilnost između samih osoba uzrokovana različitim tehnikama inhalacije te iritacija respiratornog trakta tijekom same inhalacije (Bruni i sur., 2018). Još jedan nedostatak predstavljaju dokazi da dim kanabisa djeluje mutageno, što je potvrđeno *in vitro* i *in vivo* testovima na miševima. Također, na

stanicama pluća osoba koje kronično inhaliraju pripravke kanabisa javljaju se promjene za koje se smatra da bi mogle biti prekursori za razvoj raka pluća (Hall i sur., 2005).

#### *2.5.1.3. Transmukozalni unos*

Transmukozalnim unosom, poput sublingualne administracije, izbjegava se prvotni hepatski metabolizam (Huestis, 2007). Nabiximols je primjer transmukozalnog spreja koji se upotrebljava za ublažavanje simptoma multiple skleroze, a sadrži THC i CBD u jednakim omjerima. Doza ovog lijeka ekvivalentna je 2,7 mg THC-a u 100 µL etanolnog spreja (Bruni i sur., 2018). Topički, okularni unos THC-a predložen je kao tretman za smanjenje očnog tlaka kod glaukoma (Adelli i sur., 2017).

#### *2.5.1.4. Transdermalni unos*

Još jedan način unosa THC-a uz mogućnost izbjegavanja primarnog hepatskog metabolizma i poboljšanja biodostupnosti je transdermalni unos putem flastera. Doze koje se koriste slične su oralnim dozama unosa (Bruni i sur., 2018). Unos transdermalnim putem omogućava kontinuirano otpuštanje kroz dulji vremenski period, uz istodobno minimiziranje negativnih utjecaja THC-a (Huestis, 2007). Međutim, kod ovakvog načina unosa mogu se javiti lokalne iritacije na mjestu unosa, a sam transport kanabinoida kroz vodene slojeve kože može biti ograničen (Huestis, 2007). Sigurnost i svojstva ovakvog načina unosa još uvijek se ispituju (Bruni i sur., 2018).

### *2.5.2. Distribucija*

Najviše ispitivanja vršilo se na THC-u unesenom inhalacijom. Adams i Martin ispitivali su doze THC-a potrebne da se postigne farmakološki učinak u ljudi. Utvrdili su da ako je u cigareti kanabisa 2 – 22 mg THC-a, svega 1 % te doze distribuirat će se do mozga (Adams i Martin, 1996). THC se uglavnom prenosi krvnom plazmom, vezan za lipoproteine, a svega 10 % prenosi se eritrocitima (Huestis, 2007). Dokazano je da se THC brzo distribuira prema dobro prokrvljenim tkivima i organima poput pluća, srca, jetre i mozga (Huestis, 2007; Brunet i sur., 2006).

THC prelazi placentalnu barijeru, međutim ispitivanjima na životinjama pokazalo se da su koncentracije u krvi fetusa pasa i ovaca bile niže nego u krvi i plazmi majke (Huestis, 2007), a koncentracija THC-a u krvi iz pupkovine je 3 % – 6 % niža nego u majčinoj krvi. Prijenos

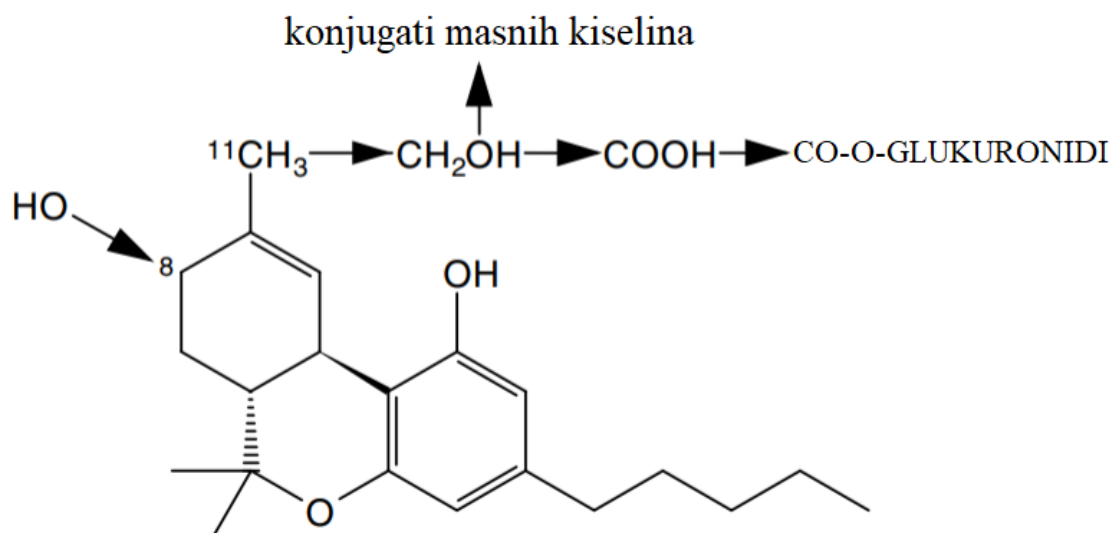
THC-a pupkovinom veći je u ranijim stadijima trudnoće, a određena koncentracija THC-a može se naći i u majčinom mlijeku s obzirom na njegovu visoku lipofilnost (Blackard i Tennes, 1984).

### 2.5.3. Metabolizam

Metabolizam THC-a u ljudi prvenstveno uključuje hepatski sustav citokroma P450 kojim nastaje aktivan metabolit 11-hidroksi- $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (11-OH-THC), dok se daljnjom oksidacijom on prevodi u inaktivni 11-nor-karboksi- $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (THC-COOH) (Abrams i Guzman, 2015; Brunet i sur., 2006). Hepatski mikrosomi CYP 450 2C9, 2C19 i 3A4 kataliziraju reakcije 1. faze metaboličke pretvorbe THC-a, što uključuje alifatsku hidroksilaciju,  $\beta$ -oksidaciju te degradaciju pentilnog bočnog lanca. Najčešća reakcija 2. faze metabolizma je konjugacija glukuronskom kiselinom. Utvrđeno je više od 100 metabolita THC-a, uključujući različite di- i tri-hidroksilne spojeve, ketone, aldehide i karboksilne kiseline. Oksidacijom psihoaktivnog metabolita 11-OH-THC nastaje inaktivan metabolit THC-COOH. Rjeđe, osim adicije glukuronske kiseline, 2. fazom metabolizma THC-COOH se može konjugirati sulfatom, glutationom, aminokiselinama i masnim kiselinama. Adicijom glukuronske kiseline povećava se topljivost u vodi i olakšava eliminacija, ali zbog vezanja na proteine niska je razina eliminacije urinom (Huestis, 2007). Metabolički putevi THC-a prikazani su slikom 4.

Međutim, sam metabolizam u većini tkiva je spor, a sporo oslobađanje kanabinoida iz tkiva i naknadni metabolizam rezultiraju dugim poluživotom THC-a. Procjenjuje se da poluživot varira između od 20 sati pa sve do 10 – 13 dana (Carter i sur., 2004).





**Slika 4.** Glavni metabolički putevi molekule  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola (THC-a)  
(Grotenhermen, 2003)

#### 2.5.4. Eliminacija

THC i njegovi metaboliti topljivi su u mastima te se koncentriraju u masnim tkivima gdje se zadržavaju kroz dulji period, u obliku konjugata masnih kiselina THC-a i kao 11-OH-THC te se izlučuju niskom brzinom (Hall i sur., 2005; Grotenhermen, 2003). Vrlo brza eliminacija primijećena je u tkivu jetre gdje se THC potpuno eliminira unutar 6 sati od injekcije. Kinetika eliminacije iz bubrega, srca, mišića i pluća usporediva je s onom opaženom u krvi. Zbog visoke lipidne topljivosti, uklanjanje iz masnog tkiva je sporo, a određene koncentracije THC-a mogu pronaći i nakon 24 sata od apsorpcije (Brunet i sur., 2006). Oko 65 % THC-a eliminira se fecesom, u obliku 11-OH-THC-a, dok se urinom eliminira 20 % (Lemberger i sur., 1971). Urinom se najčešće eliminiraju metaboliti konjugirani s glukuronskom kiselinom, čime se povećava topljivost u vodi (Sharma i sur., 2012). Učestalost unosa THC-a ne utječe na farmakokinetiku, te nisu pronađene značajne razlike u poluživotu THC-a kod povremenih i kroničnih korisnika (Huestis, 2007).

Kanabinoidi se različitim mehanizmima inkorporiraju u kosu. Na primjer, mogu se ugraditi u korijen kose koji je okružen kapilarama ili pak difundirati iz sebuma ili znoja koji se izlučuje na površinu kože vlasista. Također, postoji mogućnost zagađenja kose dimom kanabisa koji se inhalira (Huestis, 2007). Povećanjem doze THC-a ili učestalosti konzumacije, raste i njegova koncentracija u kosi (Skopp i sur., 2007).

## 2.6. UČINCI KANABISA I THC-a

U zadnje je vrijeme dostupan sve veći broj sistemskih preglednih članaka i meta-analiza koje proučavaju utjecaj kanabinoida na različite bolesti te je utvrđeno da kanabinoidi djeluju povoljno u liječenju kronične boli, smanjenju mučnine i povraćanja uzrokovanih kemoterapijom, povećanju apetita i poboljšanju sna (Whiting i sur., 2015; Husni i sur., 2014).

Kanabinoidi i kanabis predloženi su za medicinsku upotrebu u onkologiji u listopadu 2003. godine za ublažavanje simptoma nastalih korištenjem spojeva i metoda prilikom liječenja raka, ali i za tretman samog karcinoma (Hall i sur., 2005). Američki je odjel za zdravstvo i medicinu, 2017. godine, donio zaključak da postoje značajni dokazi koji potkrepljuju tvrdnje da su oralni pripravci od kanabisa učinkoviti antiemetik u liječenju mučnine i povraćanja uzrokovanih kemoterapijom te u liječenju kronične neuropatske boli i smanjenju simptoma multiple skleroze. Najčešći konzumenti pripravaka od konoplje su osobe koje pate od kroničnog artritisa i boli lokomotornog sustava (Bruni i sur., 2018). Smatra se da u liječenju boli ulogu ima sinergističko djelovanje THC-a, CBD-a te drugih fitokanabinoida i spojeva poput terpena i flavonoida prisutnih u kanabisu (Russo, 2011).

THC i ostali kanabinoidi mogu utjecati na stanični metabolizam, DNA sintezu i staničnu diobu *in vitro*, međutim takav utjecaj može radije dovesti do prestanka stanične diobe nego do razvoja raka. Ne postoje dokazi da THC i ostali kanabinoidi djeluju mutageno u standardnim mikrobnim testovima mutageneze poput Ames testa. Također se pokazalo da THC ne djeluje kancerogeno *in vivo* na laboratorijskim miševima (Hall i sur., 2005).

*In vitro* i *in vivo* studijama na miševima dokazano je da THC te ostali prirodni i sintetski kanabinoidi djeluju antineoplastično u slučajevima raka pluća, glioma, tiroidnog epiteloma, limfoma, kožnih rakova, raka maternice, dojke, prostate i neoplastoma. Sam mehanizam antineoplastičnog djelovanja nije dobro razjašnjen, ali je poznato je kanabinoidni receptori imaju ključnu ulogu njegovoj medijaciji (Hall i sur., 2005). Također se pokazalo da kanabinoidi mogu inhibirati rast tumora i inducirati apoptozu moduliranjem signalnih puteva između tumorskih stanica nekih staničnih linija raka te inhibirati angiogenezu i metastaziranje (Abrams i Guzman, 2015). Djelovanje kanabinoida je usmjereno prema stanicama raka, dok na normalne zdrave stanice nemaju takav utjecaj (Sarfaraz i sur., 2008).

Sintetički  $\Delta^9$ -THC u sezamovom ulju (dronabinol, Marinol®) bio je prvi licencirani te 1986. godine i prvi odobreni lijek na bazi kanabisa za pomoć pri liječenju mučnine i povraćanja uzrokovanih kemoterapijom (Abrams i Guzman, 2015). On također pokazuje analgetički

utjecaj prilikom liječenja boli osoba s multiplom sklerozom (Schimrigk i sur., 2017; Bruni i sur., 2018).

### 2.6.1. Negativni učinci THC-a

Kanabinoidi imaju određene psihoaktivne učinke na organizam, ali smatra se da su oni u prihvatljivim granicama uspoređujući s citotoksičnim učinkom kemoterapije i ostalih terapija korištenih u onkologiji. Međutim neki će ljudi razviti disforiju sa ili bez paranoje te za njih nije preporučljivo koristiti kanabis i njegove sastojke u terapijske svrhe (Abrams i Guzman, 2015).

Odsutnost kanabinoidnih receptora u nižim dijelovima moždanog debla objašnjava zašto visoke doze THC-a rijetko djeluju letalno (Hall i sur., 2005). Također, kanabinoidni receptori nisu prisutni u regiji *medula oblongata* i dijelovima mozga koji reguliraju kardiovaskularne i respiratorne funkcije, pa ne dolazi do predoziranja uslijed respiratorne supresije (Brunet i sur., 2006). Letalne doze izuzetno su visoke. Ekstrapolacijom rezultata dobivenih studijama na životinjama procijenjena je LD50 vrijednost na 680 kg inhalirane marihuane, unutar 15 minuta (Abrams i Guzman, 2015).

Akutna upotreba kanabinoida poput dronabinola dovodi do akutnih psihoaktivnih efekata poput vrtoglavice, depresije, halucinacija i paranoje. Najznačajnija akutna nuspojava upotrebe THC-a je smanjena psihomotorna funkcija te se iz tog razloga osobama koje konzumiraju kanabis savjetuje da ne koriste motorna vozila (Hall i sur., 2005). Osim u centralnom živčanom sustavu, kanabinoidni su receptori smješteni i u drugim tkivima organizma pa su moguće nuspojave poput tahikardije, hipotenzije, bronhodilatacije i smanjene pokretljivosti gastrointestinalnog sustava (Bruni i sur., 2018; Nugent i sur., 2017; Aviram i Samuelly-Leichtag, 2017). Međutim, tolerancija na ove nuspojave razvija se brzo u laboratorijskih životinja i ljudi (Abrams i Guzman, 2015).

### 2.6.2. Učinak THC-a u borbi protiv karcinoma

OD 1990-ih godina *in vitro* studijama dokazano je da THC, uz druge kanabinoide, ima antiproliferativnu ulogu na stanicama raka pluća, te inhibira rast stanica glioma, tiroidnog epiteloma, limfoma i stanica raka kože, maternice, dojke, gušterače, prostate, želuca i debelog crijeva (Abrams i Guzman, 2015; Patsos i sur., 2005).

Mučnina i povraćanje tijekom kemoterapije, slab apetit, gubitak težine i kaheksija neki su od najčešćih problema s kojima se susreću onkolozi. Pacijenti koji su uzimali pripravke THC-a, izvijestili su da im hrana ima bolji okus i da im se pojačao apetit uspoređujući s

placebom (Abrams i Guzman, 2015; Bar-Sela i sur., 2013). Istraživanja kanabinoida kao mogućeg lijeka za tretiranje mučnine uzrokovane kemoterapijom započela su 1970-ih (Hall i sur., 2005).

Bol u pacijenata s karcinomom posljedica je upale, konzistentna je i često je otporna na liječenje opioidima. Doze THC-a 15 mg – 20 mg koji se uzima oralno, pokazale su značajan analgetički učinak, a utjecale su i na poboljšanje apetita (Abrams i Guzman, 2015; Noyes, 1975). Sublingualni sprej THC-a ili kombinacije THC-a i CBD-a utječe na smanjenje neuropatske boli povezane s multiplom sklerozom i karcinomom (Rog i sur., 2005), a unos inhalacijom pokazao se pozitivnim kod smanjenja periferne neuropatske boli povezane s HIV-om (Abrams i Guzman, 2007).

Preklinička ispitivanja upućuju na to da kanabinoidi mogu pojačati antikancerogeni učinak konvencionalnih kemoterapijskih sredstava, a uz to imaju utjecaj i na simptome koji se javljaju u onkoloških pacijenata (Abrams i Guzman, 2015). Kombinirana antikancerogena terapija pokazala je bolju učinkovitost u usporedbi sa strategijama temeljenim na pojedinim agentima jer se tako istodobno utječe na rast, progresiju i širenje tumora na različitim razinama. U skladu s tim, kombiniranom primjenom kanabinoida s drugom antikancerogenim lijekovima širenje raka na miševima reduciralo se ukazujući na njihov sinergistički učinak. Na primjer, upotrebom THC-a u kombinaciji sa temozolomidom (spojem koji se koristi za liječenje glioblastoma) uočen je snažan antitumorski učinak čak i kod tumora otpornih na temozolomid (Guzmán i sur., 2006; Abrams i Guzman, 2015).

## **2.7. *IN VITRO* ISPITIVANJA NA STANIČNIM KULTURAMA**

*In vitro* testovi služe kao alternativni testovi istraživanja na životinjama, a uključuju ispitivanja na staničnim kulturama, linijama, dijelovima tkiva ili kulturama organa. *In vitro* sustavi idealni su za ispitivanja molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti izazvane kemijskim putem, za koju nisu pogodni *in vivo* testovi (Kniewald i sur., 2005). Stanice brzo reagiraju na kemijski uzrokovan toksičan stres te dolazi do promjene metabolizma i rasta stanica te transkripcije gena koji upravljaju osnovnim funkcijama stanice (Eisenbrand i sur., 2002).

*In vitro* testovi postali su iznimno važni za ispitivanje antikarcinogenog učinka nekog spoja, bio on novo sintetiziran ili izoliran iz prirodnih izvora, na tumorske stanične linije. Nakon tretmana, koji traje od 24 do 72 sata, najčešće slijedi primjena neke kolorimetrijske

metode kako bi se odredio postotak preživljenja stanica, odnosno inhibicija rasta stanica uslijed djelovanja ispitivanog spoja. *In vitro* testovi koriste se kao preliminarni testovi za daljnja *in vivo* istraživanja, a korisni su i za određivanje odnosa koncentracije prema vremenu izlaganja i mehanizma djelovanja ispitivane tvari. *In vitro* testovi se upotrebljavaju u ispitivanjima mutagenosti, citotoksičnosti i karcinogenosti, endokrine toksičnosti, reproduktivne toksičnosti, imunotoksičnosti, neurotoksičnosti, nefrotoksičnosti te toksičnosti na ciljne organe (Eisenbrand i sur., 2002; Tice i sur., 2000; Boyd i Paull, 1995).

Humane stanične kulture raka najčešće su korišten model za proučavanje raka i testiranje terapijske učinkovitosti novih antikancerogenih sredstava i metoda za poboljšanje učinkovitosti liječenja raka (Gillet i sur., 2013; Sharma i sur., 2010). Prva kultivirana stanična kultura bila je HeLa, dobivena je iz stanica raka grlića maternice uzetih iz pacijentice Henriette Lacks, 1951. godine (Scherer i sur., 1953). Od tada su razvijene i uzgojene mnogobrojne stanične kulture kojima se ispituju toksični učinci kemikalija i raspon toksičnog djelovanja (Gillet i sur., 2013; Tice i sur., 2000).

Prednosti korištenja staničnih kultura su: kontrolirani okolišni uvjeti, homogenost ispitivanih uzoraka, izbjegavanje istraživanja na životinjama te sama cijena i razmjer veličine ovakvih testova. Glavni problem koji se javlja kod *in vitro* ispitivanja je kontaminacija mikroorganizmima poput bakterija, gljivica i kvasaca iz okoliša laboratorija ili samog znanstvenika (Roche Diagnostics GmbH, 2012).

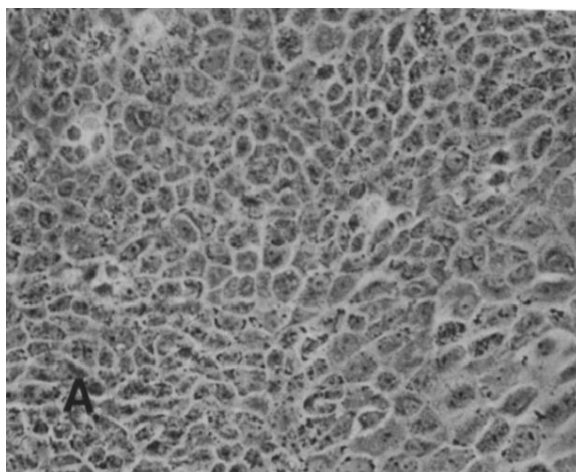
### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

U svrhu izrade ovog rada, koristio se *in vitro* test sustav staničnih kultura kontinuiranih humanih linija stanica Cal 27, Hep G2 te Caco-2, a ispitivao se utjecaj različitih koncentracija THC-a na rast stanica, oksidacijska oštećenja te genotoksičnost.

##### 3.1.1. Biološki test sustavi za utvrđivanje genotoksičnog učinka

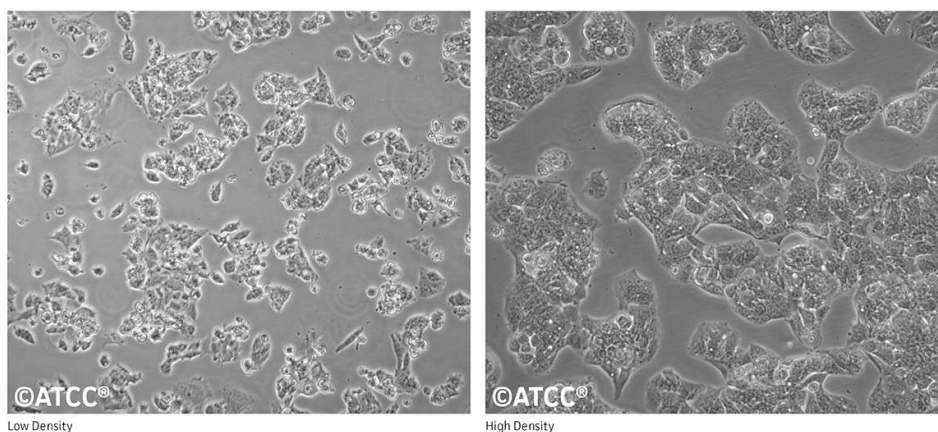
Kao biološki test sustav, u ovom radu su korištene su kontinuirane stanične linije oralnog pločastog karcinoma Cal 27, hepatocelularnog karcinoma jetre Hep G2 te adenokarcinoma epitela debelog crijeva Caco-2.



**Slika 5.** Stanična linija Cal 27 (Gioanni i sur., 1988)

Cal 27 (slika 5) kontinuirana je stanična linija pločastih epitelnih stanica raka jezika. Stanice su uzorkovane s lezije jezika oralnog karcinoma pacijenta bijele rase u dobi od 56 godina, 1982. godine, a staničnu je kulturu uspostavio J. Gioanni (Gioanni i sur., 1988). Kontinuirana stanična linija Cal 27 jedna je od najčešće korištenih staničnih linija za proučavanje utjecaja ispitivanih spojeva i kemikalija na pločaste epitelne stanice oralnih karcinoma (Jiang i sur., 2009). THC se najčešće unosi u organizam oralnim putem u obliku tableta i ulja ili inhalacijom, te sama apsorpcija započinje već oralnim epitelnim stanicama (Grotenhermen, 2003).

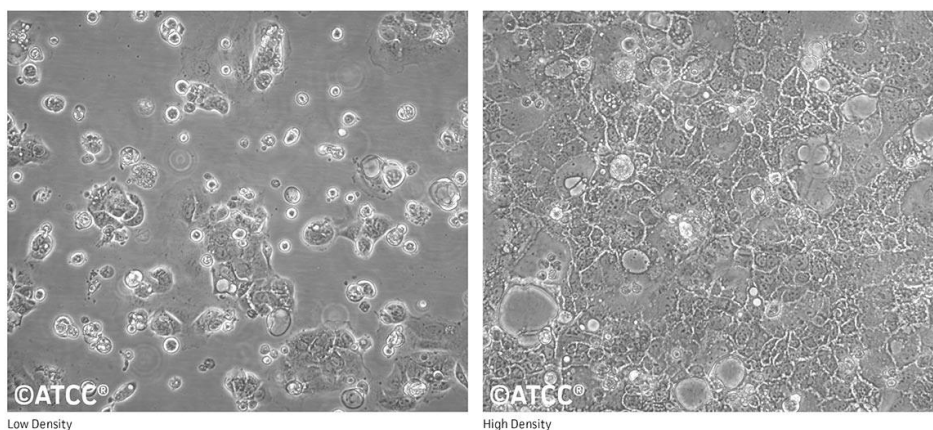
ATCC Number: **HB-8065**  
Designation: **Hep G2**



**Slika 6.** Stanična linija Hep G2 (ATCC, 2017)

Hep G2 (slika 6) kontinuirana je epitelna stanična linija dobivena iz jetre hepatocelularnog karcinoma pacijenta bijele rase u dobi od 15 godina (Mersch-Sundermann i sur., 2004). Kontinuirana stanična linija Hep G2 redovito se koristi u *in vitro* ispitivanjima toksičnosti spojeva jer je jetra glavni metabolički organ. Humana tumorska stanična linija Hep G2 koristi se u ispitivanjima djelotvornosti i toksičnosti lijekova, a također i u znanstvenim ispitivanjima hepatocelularnog metabolizma i toksičnosti ksenobiotika, otkrivanju prehrambenih i okolišnih citotoksičnih i genotoksičnih agenasa, kao i citoprotektivnih i antigenotoksičnih agenasa te razumijevanju hepatokarcinogeneze (Mersch-Sundermann i sur., 2004; Dehn i sur., 2004). Hep G2 stanična linija također je bitna kao prvi korak u istraživanjima spojeva potencijalnog antitumorskog djelovanja (Batra i Sharma, 2013). THC, unesen oralnim putem ili inhalacijom, ulazi u opsežan prvotni metabolizam jetrom, što posljedično utječe i na smanjenje biodostupnosti samog THC-a, ali i nastanak različitih intermedijara te konačnih produkata različite toksičnosti (Grotenhermen, 2003).

ATCC Number: **HTB-37**  
Designation: **Caco-2**



**Slika 7.** Stanična linija Caco-2 (ATCC, 2017)

Caco-2 (slika 7) kontinuirana je epitelna stanična linija kolorektalnog karcinoma dobivena iz adenokarcinoma debelog crijeva pacijenta bijele rase u dobi od 72 godine. Stanice ove stanične kulture spontano diferenciraju i stvaraju monosloj stanica koji morfološki i funkcionalno ima slične karakteristike zrelog enterocita (Sambuy i sur., 2005). Dokazano je da ispitivanja na kontinuiranoj staničnoj liniji Caco-2 pouzdano koreliraju sa studijama o apsorpciji lijekova i drugih spojeva nakon oralnog unosa kod ljudi (Lea, 2015). Prema tome, ova se linija, osim za istraživanja tumora, upotrebljava i za proučavanje stanične permeabilnosti potencijalnog lijeka, kemijske karakteristike pasivne difuzije lijeka, toksičnosti nekog pojedinog lijeka te ostalih učinaka na transepitelni transport (Meunier i sur., 1995).

Navedene stanične linije kultivirane su u monosloju u plastičnim T-bocama ravnih stijenki te u mikrotitarskim pločicama s jažicama u inkubatoru pri 37 °C u vlažnoj atmosferi (relativna vlažnost zraka 95 %) uz 5 % CO<sub>2</sub>. Kao medij za rast korišten je kompletirani medij *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Invitrogen) uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal Bovine Serum*, FBS) konačne koncentracije od 10 %. Prilikom presađivanja stanica za potrebe eksperimenata, stanice su odlijepljene i razdvojene pomoću 0,25 %-tne otopine tripsina.



### 3.1.2. Tetrahidrokanabinol (THC)

Tetrahidrokanabinol je prozirna smolasta tvar kojoj povećanjem temperature raste i viskoznost (THC Pharm, Njemačka). Za potrebe eksperimenta, otopine THC-a u mediju za rast stanica pripremane su neposredno prije primjene.

Koncentracije otopina THC-a čiji je genotoksični učinak utvrđen u ovom radu kretale su se u rasponu od  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  do  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Vrijeme tretmana stanica bilo je 2 sata, 4 sata, 24 sata i 48 sati.

Kanabis i THC ne prate tipičan model doziranja lijekova. U samoj su biljci prisutne velike varijacije kanabinoida koje ovise o fenotipu, vremenu berbe i okolišnim uvjetima. Osim toga, velike su individualne razlike između osoba, neki su puno osjetljiviji od drugih na učinke THC-a, što utječe na bioraspoloživost i apsorpciju THC-a (Carter i sur., 2004). Iz tog je razloga teško utvrditi dozu THC koja ima terapijski učinak za ljude.

Raspon koncentracija je odabran s obzirom na doze čija se učinkovitost ispitivala *in vitro* ili *in vivo* sustavima, te doze koje se primjenjuju kod ljudi za ublažavanje boli i smanjenje simptoma kemoterapije te bolesti poput multiple skleroze. Doze THC-a do 20 mg (što odgovara masenoj koncentraciji od  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  osobe od 70 kg) koji se uzima oralno pokazale su značajan analgetički i antineoplastični učinak kod osoba oboljelih od karcinoma (Abrams i Guzman, 2015; Munson i sur., 1975).

U *in vitro* istraživanjima najčešće su upotrebljavane doze THC-a u koncentraciji  $0,1 - 50 \mu\text{M}$  (što odgovara masenoj koncentraciji od  $0,031 \mu\text{g mL}^{-1} - 15,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Martín-Banderas i sur., 2015; Massi i sur., 2003; Scott i sur., 2017). *In vitro* istraživanje na humanim stanicama glioma pokazalo je da CBD inhibira proliferaciju stanica tumora pri koncentraciji  $24,1 \pm 2,16 \mu\text{M}$  (što odgovara masenoj koncentraciji od  $7,58 \pm 0,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Massi i sur., 2003). *In vitro* istraživanje na humanoj staničnoj liniji raka pluća A-549 pokazalo je da inhibitorna koncentracija THC-a ( $\text{IC}_{50}$ ) iznosi  $99,2 \pm 41,4 \mu\text{M}$  (što odgovara masenoj koncentraciji od  $31,19 \pm 13,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Martín-Banderas i sur., 2015). Ta koncentracija također odgovara koncentraciji THC-a u dronabinolu koji se upotrebljava kao suportivna terapija osobama na kemoterapiji (Abrams i Guzman, 2015; Schimrigk i sur., 2017). Jedna cigareta marihuane obično sadrži oko 7 – 18 mg THC-a (Harder i Rietbrock, 1997; Zuurman i

sur., 2009). *In vivo* istraživanjem na štakorima dokazano je da oralna doza LD<sub>50</sub> THC-a iznosi 800 µg mL<sup>-1</sup> za štakore (Rosenkrantz i sur., 1974).

### 3.1.3. Kemikalije

- 2',7'-diklorofluorescein diacetat (DCF-DA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Agaroza niske točke tališta (LMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Agaroza normalne točke tališta (NMP), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Bovine serum albumin (BSA), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Dimetil-sulfoksid (DMSO), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Etidij-bromid (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>), *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Fetal Bovine Serum (FBS), *Gibco, Carlsbad, SAD*
- Kalij-hidrogenfosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Kalij-klorid (KCl), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Na<sub>2</sub>EDTA, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Natrij-hidrogenfosfat dodekahidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Natrij-hidroksid (NaOH), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Natrij-klorid (NaCl), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Natrij-laurilsarkozinat (Na-laurilsarkozinat), *Sigma-Aldrich-Chemie, Njemačka*
- Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid), *Steinheim, Njemačka*
- Octena kiselina (CH<sub>3</sub>COOH), *Kemika, Zagreb, Hrvatska*
- Roswell Park Memorial Institute medij s 2000 mg L<sup>-1</sup> glukoze, 5958 mg L<sup>-1</sup> 25 mM HEPES-a i L-glutaminom (RPMI 1640), *Invitrogen, SAD*
- Tetrahidrokanabinol (THC), *THC Pharm, Njemačka*
- Tripsin, *Gibco, Carlsbad, SAD*
- Tris-HCl, *Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Njemačka*
- Triton X-100, *Sigma-Aldrich-Chemie, SAD*
- Vodikov peroksid, *Kemika, Zagreb*

### 3.1.4. Priprema otopina korištenih u eksperimentima

#### 3.1.4.1. Otopine korištene za provođenje testa citotoksičnosti

a) Fosfatni pufer – PBS (pH = 7,2 - 7,4):

Natrijev-klorid	4,0 g
Kalijev-klorid	0,1 g
Natrijev-hidrogenfosfat dodekahidrat	1,16 g
Kalijev-hidrogenfosfat	0,1 g
Destilirana voda	500,0 mL
Sterilizira se 15 minuta pri 120 °C i tlaku $1,01 \times 10^5$ Pa	

b) Ishodišna otopina Neutral red ( $\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$ ):

Neutral red	50,0 mg
Etanol	10,0 mL

- iz nje je pripremljena radna, 10 %-tna otopina Neutral red-a

c) Otopina za odbojavanje:

Octena kiselina	1,0 mL
Etanol	50,0 mL
Destilirana voda	49,0 mL

#### 3.1.4.2. Otopine korištene za određivanje reaktivnih kisikovih radikala

a) Ishodišna otopina 2',7'- diklorofluorescin diacetat (DCF-DA):

DCF-DA	1,5 mg
DMSO	1,5 mL

- iz nje je pripremljena radna otopina 2',7'- diklorofluorescin diacetat (DCF-DA), u PBS puferu, koncentracije 0,05 mM

#### 3.1.4.3. Otopine korištene za provođenje komet testa

a) Otopina NMP agaroze 1,5 %, pripremljena je u PBS puferu

b) Otopina LMP agaroze 0,5 %, pripremljena je u PBS puferu

c) Pufer za lizu stanica (pH = 7,5):

Natrij-klorid (2,5 M)	130,0 g
Na <sub>2</sub> EDTA (100 mM)	29,225 g
Tris-HCl (10 mM)	1,078 g

Na-laurilsarkozinat (1 %) 8,9 g

Čuvanje na sobnoj temperaturi.

Sat vremena prije lize stanica, u 89 mL matične otopine pufera za lizu potrebno je dodati 1 mL Triton X-100 i 10 mL 10 %-tne otopine DMSO. Pripremljenu otopinu čuvati u hladnjaku 1 h te je nakon toga spremna za obradu stanica.

d) Pufer za elektroforezu (pH = 7,5):

Natrij-hidroksid (10 M) 30,0 mL

Na<sub>2</sub>EDTA (200 mM) 5,0 mL

Destilirana voda 965,0 mL

e) Pufer za neutralizaciju (pH = 7,5):

Tris-HCl 48,5 g

Destilirana voda 1000,0 mL

f) Otopina etidij-bromida:

Etidij-bromid 2,0 µg

Destilirana voda 1,0 mL

### 3.1.5. Laboratorijska oprema

#### 3.1.5.1. Laboratorijski uređaji

- Analitička vaga, 1712 Mp8, Silver Edition, Sartorius, Velika Britanija
- Centrifuga za Eppendorf epruvete, HC-240, Tehnica-Železniki, Slovenija
- Čitač mikrotitarskih pločica, Cecil Instruments Ltd, Engleska
- Epifluorescencijski mikroskop, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Njemačka
- Fluorimetar, FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg, Njemačka
- Inkubator s kontroliranom atmosferom CO<sub>2</sub>, Forma Scientific, SAD
- Invertni mikroskop, Optika Microscopes, Ponteranica, Italija
- Klasična centrifuga, Megafuge 1.0 Heraeus, Sepatech, Gottlieb, Italija
- Komora za sterilan rad, IBK 1 V2, Iskra, Šentjernej, Slovenija
- Miješalica, MS1 minishaker, IKA®Works, Inc. Wilmington, Staufen, Njemačka
- Spektrofotometar, Cecil Instruments Ltd, Technical Centre Cambrige, Engleska
- Sustav za analizu slike i mjerenje kometa Comet Assay II, Perceptive Instruments Ltd, UK

- Termoblok, *ISKRA, Slovenija*
- Uređaj za elektroforezu, *Life Technologies, New York, SAD*
- Vibromikser EV-202 i EV-100, *Tehtnica-Železniki, Slovenija*

### 3.1.5.2. Laboratorijski pribor

- Brušena predmetna stakalca
- Bürker-Türkova komorica
- Eppendorf epruvete
- Erlenmeyerove tikvice, 20-100 mL
- Kivete za spektrofotometar
- Laboratorijske žlice
- Menzure, 50-1000 mL
- Mikropipete, 10, 20, 200, 1000 µL, *Eppendorf, Hamburg, Njemačka*
- Mikrotitarske pločice (96 well), *Falcon, SAD*
- Pasteurove pipete, 5-25 mL
- Plastične sterilne Petrijeve zdjelice, *Aptaca, Canelli, Italija*
- Pokrovnna stakalca
- Staklene epruvete, 10 mL
- Staklene pipete, 1-20 mL
- T-boca, *Falcon, BD Company, Franklin Lakes, SAD*
- Vata za pravljenje čepova

## 3.2. METODE

Kontinuirane stanične linije Cal 27, Hep G2 i Caco-2 tretirane su različitim koncentracijama THC-a, a njegov toksičan učinak na stanice ispitivao se Neutral red testom, DCF-DA fluorimetrijskim testom te komet testom.

### 3.2.1. Nasađivanje i kultivacija staničnih linija Cal 27, Hep G2 i Caco-2 u monosloju

Sav rad sa staničnim kulturama mora se odvijati u komori za sterilan rad, kako bi se osigurali aseptički uvjeti. Stanične linije čuvaju se na temperaturi -80 °C u krioprotektivnom sredstvu, 10 % glicerolu ili 10 % DMSO-u. Prije rada potrebno ih je naglo odmrznuti u vodenoj kupelji pri temperaturi od 37 °C. Nakon toga slijedi centrifuga stanica (100 rpm / 5

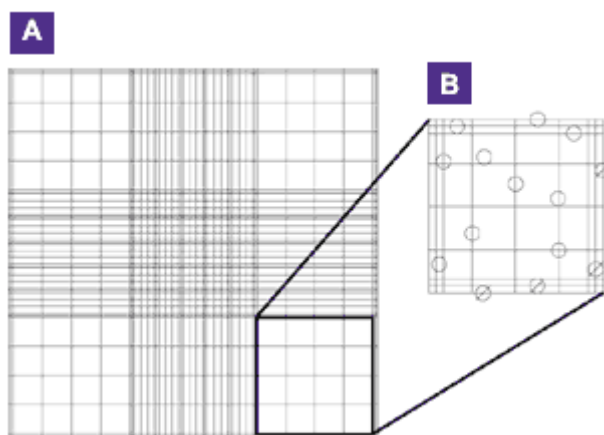
min) da bi se uklonio supernatant u kojem se nalaze ostaci medija i glicerola. Stanični talog se resuspendira u svježem mediju, zagrijanom na 37 °C te se stanice ponovo centrifugiraju (1000 rpm / 1,5 min) i resuspendirani stanični talog se nasađuje u Petrijeve zdjelice promjera 5 cm, čime se omogućuje propagacija stanica. Nakon 24 sata, stanice se nasađuju u T-boce većeg volumena i uzgajaju u kontroliranim uvjetima atmosfere u inkubatoru, odnosno pri 37 °C uz 95 % zraka i 5 % CO<sub>2</sub>, do subkonfluentnog stanja kada se mogu koristiti za eksperimentalna ispitivanja (Freshney, 2010).

#### *3.2.1.1. Priprema stanične suspenzije iz subkonfluentnog monosloja*

Kada stanice postignu subkonfluentno stanje, iz T-boca se uklanja medij, a potom je stanice potrebno isprati tripsinom da bi se uklonili ostaci medija koji sadrži serum koji djeluje kao inhibitor proteolitičkog djelovanja tripsina. Tripsin se dodaje na stanice u minimalnim količinama, dovoljnim da se pokrije dno T-boce u kojoj je stanična kultura rasla. Tripsinizacijom dolazi do odvajanja stanica od podloge, a proteolitički se učinak tripsina zaustavlja dodatkom medija sa serumom na stanice (Freshney, 2010). U T-bocama se ostavlja manja količina stanica te se, uz dodatak svježeg medija, omogućuje njihov daljnji rast (Freshney, 2000).

#### *3.2.2. Određivanje broja stanica pomoću hemocitometra*

Brojanje stanica vrši se pomoću Bürker-Türkove komorice pod svjetlosnim mikroskopom. Izuzetno je važno stanice izbrojati prije početka izvođenja eksperimenta kako bi se utvrdilo koliko stanica je potrebno nasaditi da bi u konačnici usporedivi broj stanica bio izložen djelovanju ispitivanog spoja. Po završetku tripsinizacije, 20 µL uzorka stanične suspenzije uzima se mikropipetom te se nakon resuspenzije 10 µL nanosi na Bürker-Türkovu komoricu, ispod prethodno postavljenog pokrovnog stakalca (Slika 8). Potrebno je izbrojati stanice u četiri velika kvadrata, a svaki se veliki kvadrat sastoji od 16 malih kvadrata. Volumen svakog velikog kvadrata je 10<sup>-4</sup> mL, odnosno prostor između pokrovnog stakalca i predmetnice (ukoliko je pravilno postavljena bit će vidljivi Newtonovi kolobari) iznosi 0,1 mm, a površina svakog kvadrata je 1 mm<sup>2</sup>. Potrebno je odrediti srednju vrijednost izbrojenih stanica, a konačan rezultat izražava se kao broj stanica po 1 mL stanične suspenzije, tj. prema jednadžbi [1].



**Slika 8.** Brojanje stanica pomoću hemocitometra (ISB, 2013)

$$\text{Ukupan broj stanica} = \text{srednja vrijednost izbrojanih stanica} * 10^4 (\text{stanica mL}^{-1})$$

[1]

### 3.2.3. Određivanje citotoksičnog učinka različitih koncentracija THC-a na staničnim linijama Cal 27, Hep G2 i Caco-2

Jedan od najčešće korištenih testova za određivanje citotoksičnosti nekog spoja je Neutral red test (eng. *neutral red*, NR). Neutral red (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin hidroklorid) je slabo kationska boja koja se aktivnim transportom unosi u stanicu i veže za anionske dijelove lizosomskog matriksa elektrostatskim hidrofobnim vezama. Ksenobiotici dovode do oštećenja stanične ili lizosomske membrane te tako smanjuju unos i zadržavanje boje. Mrtve stanice, ili one kod kojih je došlo do oštećenja, neće vezati NR zbog promjene pH gradijenta. Ova metoda omogućuje kvantitativno određivanje broja živih stanica koja je u direktnoj ovisnosti o utjecaju ispitivanog ksenobiotika na morfologiju stanice. Boja nakupljena u stanicama ekstrahira se otopinom za odbojavanje te se mjeri apsorbanacija (Repetto i sur., 2008; Babich i Borenfreund, 1991).

Ispitivanje citotoksičnosti provedeno je na staničnim linijama Cal 27, Hep G2 i Caco-2. Suspenzije stanica (Cal 27, Hep G2 i Caco-2) naciepljuju se na mikrotitarske pločice s 96 jažica u koncentraciji od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  ( $100 \mu\text{L}$  po jažici), koje se inkubiraju 24 sata pri  $37^\circ\text{C}$  kako bi došlo do njihovog vezanja i diobe. Nakon inkubacije, kad su se stanice prihvatile za podlogu i kad je dioba stanica započela, uklanja se medij sa stanica. Slijedi tretman stanica prethodno pripremljenim otopinama THC-a u koncentracijama  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $36$

$\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  te  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati pri  $37^\circ\text{C}$ . Kao negativna kontrola korišten je uzgojni medij.

Po završetku tretmana, iz jažica su uklonjene otopine THC-a i medij, a stanice su isprane PBS puferom ( $100 \mu\text{L}$ ) kako bi se uklonili ostaci otopine THC-a i medija. Na isprane stanice, koje se nalaze u jažicama, potom se dodaje otopina Neutral red boje ( $100 \mu\text{L}$  po jažici), te slijedi inkubacija 1 sat pri  $37^\circ\text{C}$ . Neutral red boja se nakon inkubacije uklanja iz jažica, stanice se ispiru sa  $100 \mu\text{L}$  PBS pufera te im se dodaje otopina za odbojavanje ( $100 \mu\text{L}$ ) kako bi se boja ekstrahirala iz lizosoma živih stanica (Repetto i sur., 2008). Intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrom pri valnoj duljini od  $520 \text{ nm}$ , a proporcionalan je broju preživjelih stanica. Pritom se kao slijepa proba koristi jažica u koju nisu bile naciepljene stanice. Postotak preživljenja računa se u odnosu na negativnu kontrolu prema jednadžbi [2].

$$\text{Preživljenje stanica (\% u odnosu na kontrolu)} = \left( \frac{A_{520\text{nm otopine THC-a}}}{A_{520\text{nm kontrole}}} \right) * 100$$

[2]

#### 3.2.4. Određivanje prooksidativnog učinka različitih koncentracija THC-a na staničnim linijama CAL 27, Hep G2 i Caco-2 DCF-DA testom

Reaktivni kisikovi radikali (ROS), nastali bazalnim metabolizmom stanica ili metabolizmom ispitivanog ksenobiotika, određuju se DCF-DA fluorimetrijskim testom. DCF-DA (2',7'-diklorofluorescein diacetat) nepolarni je i neionski spoj koji ne fluorescira. On lako prolazi kroz staničnu membranu i u citosolu stanica se, djelovanjem intracelularnih enzima, prevodi u 2',7'-diklorofluorescein (DCFH), spoj koji također nije fluorescentan. Međutim, u prisutnosti ROS-a, DCFH se oksidacijom prevodi u DCF (diklorofluorescein) koji je izrazito fluorescentan (Li i sur., 2000). Sam intenzitet fluorescencije proporcionalan je prisutnosti slobodnih radikala u stanici.

DCF-DA metoda osjetljiva je na fotooksidaciju pa je radnu otopinu potrebno pripremiti neposredno prije izvođenja eksperimenta (Wang i Joseph, 1999). Mjerenje fluorescencije vrši se u fluorimetru pri valnim duljinama od  $485 \pm 10 \text{ nm}$  za ekscitaciju i  $530 \pm 12,5 \text{ nm}$  za emisiju (Silveira i sur., 2003).

Kako bi se odredio prooksidativni učinak različitih koncentracija THC-a na stanice, suspenzije CAL 27, Hep G2 i Caco-2 se naciepljuju na crne mikrotitrarske pločice s 96 jažica



u koncentraciji od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  te se inkubiraju 24 sata pri  $37^\circ\text{C}$ . U svaku se jažicu nacijepi po  $100\ \mu\text{L}$  stanične suspenzije, a nakon inkubacije se uklanja medij sa stanica. Zatim slijedi tretiranje stanica prethodno pripremljenim otopinama THC-a u koncentracijama  $0,33\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $36\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200\ \mu\text{g mL}^{-1}$  te  $800\ \mu\text{g mL}^{-1}$ , te se stanice inkubiraju 2, 4, 24, odnosno 48 sati pri  $37^\circ\text{C}$ , a kao negativna kontrola koristi se uzgojni medij.

Nakon tretmana se iz jažica uklanjaju otopine THC-a i medij, a stanice se ispiru sa po  $100\ \mu\text{L}$  PBS pufera kako bi se uklonili ostaci otopine THC-a i medija. Potom se na stanice dodaje  $100\ \mu\text{L}$   $50\ \mu\text{M}$  otopine DCFH-DA koja je pripremljena u PBS-u. Stanice se inkubiraju 30 minuta pri  $37^\circ\text{C}$  te se mjeri intenzitet fluorescencije fluorimetrom pri valnoj duljini ekscitacije od  $485\ \text{nm}$  i valnoj duljini emisije  $530\ \text{nm}$  ( $\lambda_{\text{em}}485\ \text{nm}$  i  $\lambda_{\text{ex}}530\ \text{nm}$ ). Jažica u koju nisu nacijepijene stanice služi kao slijepa proba.

Potencijalno prooksidativno djelovanje THC-a određeno je usporedbom intenziteta fluorescencije negativne kontrole i stanica tretiranih različitim koncentracijama THC-a. Postotak indukcije slobodnih radikala računa se prema jednadžbi [3], u odnosu na negativnu kontrolu. Svaka je koncentracija ispitivana u osam replika.

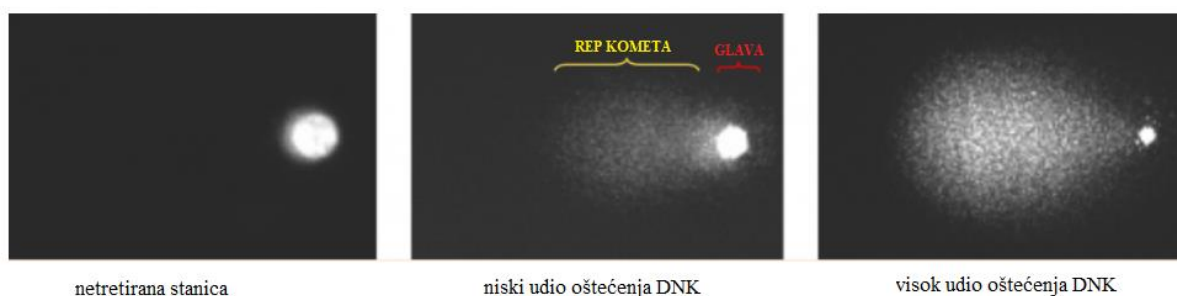
$$\text{Indukcija slobodnih radikala (\% u odnosu na kontrolu)} = \frac{(\text{intenzitet fluorescencije otopine THC} - a / \% \text{ preživljenja}) / \text{intenzitet fluorescencije kontrole} * 100}{[3]}$$

### 3.2.5. Određivanje oštećenja DNK komet testom izazvanih različitim koncentracijama THC-a na staničnim linijama Cal 27, Hep G2 i Caco-2

Komet test (eng. *single cell gel electrophoresis* ili *comet assay*, SCGE) jednostavna je i osjetljiva metoda je koja omogućuje brzo otkrivanje i mjerenje razine oštećenja popravka molekule DNK na razini pojedinačne stanice (Dusinska i Collins, 2008). Ova metoda često se koristi za procjenjivanje genotoksičnog potencijala nekog prirodnog spoja u *in vitro* istraživanjima (Salopek-Sondi i sur., 2010).

Metoda se sastoji od horizontalne elektroforeze pojedinačnih stanica u agaroznom gelu. Otopinom visoke koncentracije EDTA (etilen-diamin-tetraoctene kiseline) i detergenata stanice se liziraju kako bi se uklonili stanični proteini, tj. histoni i omogućilo odmatanje DNK molekule u alkalnim ili neutralnim uvjetima. DNK se zatim podvrgava elektroforezi tijekom koje mali fragmenti DNK, nastali lomovima (kromosomskim aberacijama), putuju kroz pore

gela prema anodi, a intaktna DNK zbog velike molekularne mase nema tu sposobnost (Collins i sur., 2008). Kraći fragmenti kroz agarozni gel putuju brže, pa zbog razlike u njihovoj duljini i brzini kretanja dolazi do razdvajanja prema veličini. Nakon bojanja fluorescencijskom bojom, kretanja DNK i njenih fragmenata pod mikroskopom su vidljivi kao „kometi“. Intaktna DNK čini glavu kometa, a rep se sastoji od fragmenata DNK (Gamulin i sur., 2007). Duljina repa ovisi o oštećenjima DNK, a količina DNK oslobođena iz glave izravno je proporcionalna nastalim oštećenjima (Collins i sur., 2008), kao što je prikazano na Slici 9.



**Slika 9.** Prikaz izgleda kometa netretirane stanice te ovisnost duljine repa o oštećenjima DNK (Toxys)

Za mjerenje i analizu kometa najčešće se koristi epifluorescencijski mikroskop i računalni program za analizu slike *Comet Assay II*, određuju se dužina repa, intenzitet repa i repni moment kometa (Perceptive Instruments Ltd., UK). Dužina repa kometa predstavlja najveću udaljenost na koju su otputovali najkraći odlomljeni fragmenti DNK, izražava u  $\mu\text{m}$ , a obično se mjeri od sredine ili ruba glave kometa. Intenzitet repa kometa izražava se u odnosu na ukupnu količinu DNK u kometu, označava postotak DNK koji je migrirao u rep. Repni moment umnožak je dužine repa i postotka DNK u repu. Dulji rep, veći intenzitet repa i veći repni moment ukazuju na veća oštećenja molekule DNK, a kao prihvatljiva razina oštećenja smatraju se vrijednosti do 10 % DNK u repu kometa (Collins i sur., 2008).

U plastične se Petrijeve zdjelice promjera 5 cm nacjepljuje po 3 mL stanične suspenzije Cal 27, Hep G2 te Caco-2 u koncentraciji od  $10^5$  st  $\text{mL}^{-1}$  te se stanice inkubiraju 24 sata pri  $37^\circ\text{C}$ . Po završetku inkubacije, sa stanica se uklanja medij te se stanice tretiraju različitim koncentracijama THC-a koje su odabrane s obzirom na rezultate preživljenja. Za tretman stanične linije Cal 27 u trajanju inkubacije 2, 4, 24 i 48 sati korištene su koncentracije THC-a  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Za tretman stanične linije Hep G2 u trajanju inkubacije 2, 4,

i 48 sati korištene su koncentracije THC-a  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a za tretman u trajanju inkubacije 4 sata korištena je koncentracija THC-a  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  pošto su veće koncentracije pokazale značajan učinak na smanjenje postotka preživljenja stanica. Za tretman stanične linije Caco-2 u trajanju inkubacije 2 i 4 sata korištene su otopine THC-a u koncentracijama  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a za tretman u trajanju inkubacije 24 i 48 sati korištene su otopine THC-a u koncentracijama  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Kao negativna kontrola koristio se medij, a kao pozitivna kontrola korištena je  $100 \mu\text{M}$  otopina vodikovog peroksida.

Po završetku tretmana, iz Petrijevih su zdjelica su uklonjene otopine THC-a i medij, a stanice su ispirane PBS puferom (1 mL) da bi se uklonili ostaci otopine THC-a i medija. Potom se stanice tripsinizirane, prebačene se u Eppendorf epruvete uz dodatak 0,5 mL medija i centrifugirane (5000 rpm / 5 min). Nakon toga, sa staničnog taloga uklonjen je supernatant, a talog je još jednom ispran (1 mL PBS pufera, 5000 rpm / 5 min). Nakon uklanjanja supernatanta, suspenzija stanica stavlja se u led kako bi se tijekom pripreme uzoraka izbjegao popravak ili nastanak novih lomova.

Na brušena se predmetna stakalca nanosi po  $300 \mu\text{L}$  otopine 1,5 %-tne agaroze normalne točke tališta (eng. *normal melting point*, NMP) koja je pripremljena kuhanjem u PBS puferu. Polimerizacija se odvija pri  $4^\circ\text{C}$  u vlažnoj atmosferi, a nakon toga su stakalca spremna za nanošenje uzoraka. Na polimerizirani sloj NMP agaroze nanosi se sloj od  $100 \mu\text{L}$  0,5 %-tne agaroze niske točke tališta (eng. *low melting point*, LMP) zagrijane na  $37^\circ\text{C}$ , u kojoj su resuspendirane stanice. Nakon polimerizacije LMP agaroze s resuspendiranim stanicama, nanosi se još jedan sloj LMP agaroze. Nakon što zadnji sloj agaroze polimerizira, provodi se liza stanica u ohlađenom puferu za lizu stanica ( $4^\circ\text{C}$  / 1 sat). Zatim se stakalca prenose u elektroforetsku kadicu, prethodno napunjenu puferom za elektroforezu (alkalnog pH). Elektroforeza se provodi pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V u trajanju od 20 minuta. Stakalca se, nakon što ih se izvadi iz elektroforetske kadice, ispiru puferom za neutralizaciju (0,4 M Tris-HCl pufer, pH = 7.5) pri sobnoj temperaturi, tri puta po 5 minuta. Ovako pripremljeni mikrogelovi bojaju se etidij bromidom ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $V = 50 \mu\text{L}$ ) u trajanju od 10 minuta te se kratko ispiru sa Tris-HCl puferom (pH = 7,5). Radi stabilizacije boje preparati se prije mikroskopske analize drže u hladnom i u mraku.

Mjerenje uzoraka vrši se pomoću epifluorescentnog mikroskopa ekscitacijskim filterom podešenim na 515 – 560 nm, a za analizu slike koristi se program *Comet Assay II*. Na svakom je stakalcu izmjereno po 150 kometa. Ovaj program istovremeno mjeri različite parametre kometa, a za potrebe ovog istraživanja korišteni su parametri dužina repa,

intenzitet repa i repni moment kao pokazatelj razine oštećenja molekule DNK, uzrokovane genotoksičnim učinkom otopina THC-a različitih koncentracija.

### 3.2.6. Statistička obrada podataka

Dobiveni su rezultati prikazani grafičkim oblikom kao srednje vrijednosti i njihove standardne devijacije. Rezultati testova citotoksičnosti, indukcije slobodnih radikala i parametri komet testa statistički su obrađeni jednosmjernom analizom varijance (one-way ANOVA) korištenjem Scheffé-ovog *post hoc* testa uz granicu statističke značajnosti  $P < 0,05$  korištenjem programskog sustava JASP 0.10.0.0.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Citotoksični, prooksidativni i mutageni učinak otopina različitih koncentracija THC-a istraženi su na kontinuiranim humanim staničnim linijama Cal 27, Hep G2 i Caco-2 u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 te 48 sati. Citotoksičnost otopina različitih koncentracija THC-a određena je Neutral red testom, prooksidativnost DCFH-DA testom, a genotoksični učinak na DNK određen je komet testom izvršenim na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

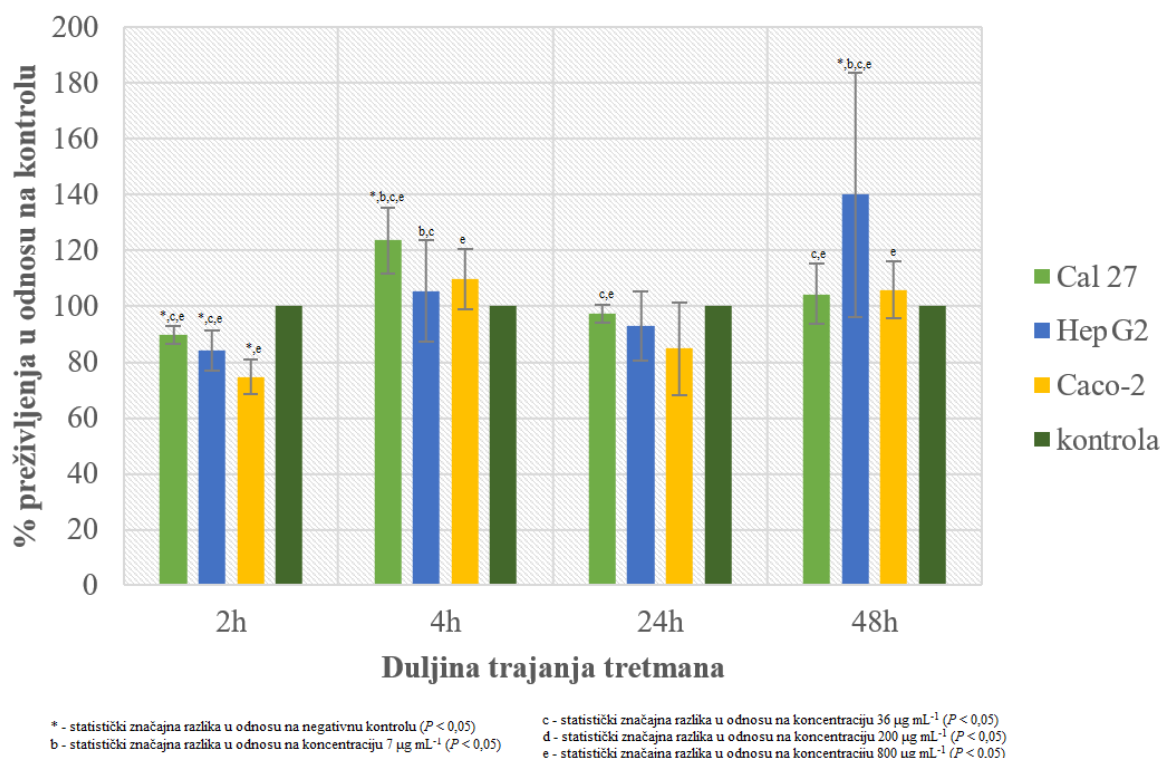
### 4.1. ODREĐIVANJE CITOTOKSIČNOG UČINKA THC-a

Ispitivanje citotoksičnog učinka otopina THC-a pri koncentracijama  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$  provedeno je Neutral red testom, opisanim u poglavlju 3.2.3., na staničnim linijama Cal 27, Hep G2 te Caco-2. Citotoksični učinak otopina THC-a praćen je u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati, nakon čega je određeno njihovo preživljenje u odnosu na negativnu kontrolu, odnosno na netretirane stanice.

Rezultati su prikazani grafički u obliku ovisnosti preživljenja stanica (relativna vijabilnost stanica izračunata je iz vrijednosti apsorbancije kao postotak kontrole) o korištenim koncentracijama THC-a.

Na slikama 10 – 14 prikazani su rezultati analize testa citotoksičnog učinka otopine THC-a pri koncentracijama  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati.

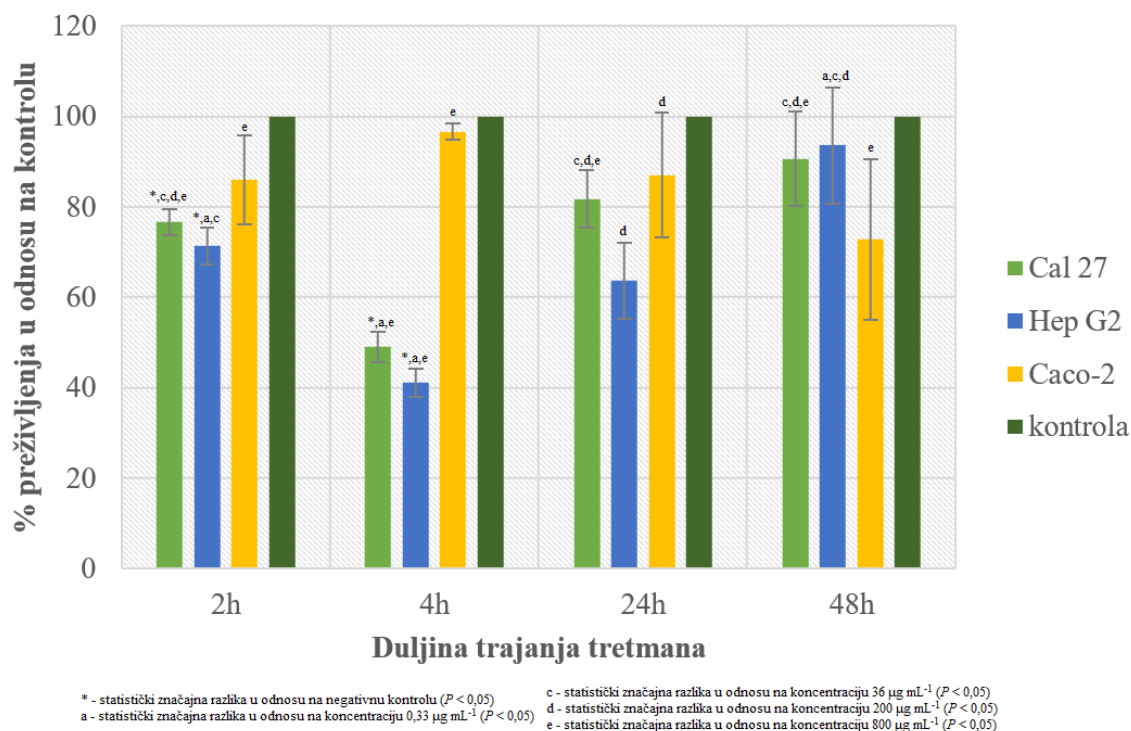
Određivanje citotoksičnosti Neutral red testom omogućuje kvantitativno određivanje broja živih stanica koja je u direktnoj ovisnosti o utjecaju otopine THC-a na morfologiju stanica (Repetto i sur., 2008).



**Slika 10.** Preživljenje staničnih linija Cal 27, Hep G2 i Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentraciji  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju 2, 4, 24 i 48 sati

Na slici 10 vidljivo je da otopina THC-a najmanje ispitivane koncentracije ( $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) najveći citotoksičan učinak na stanične linije Cal 27, Hep G2 i Caco-2 pokazuje kod duljine tretmana u trajanju 2 sata. Međutim, produljenjem tretmana, dolazi do ponovne proliferacije stanica što upućuje na zaključak da ovako niska koncentracija ne djeluje citotoksično na stanice. Međutim, nastavkom produljenja tretmana i ponovljivo izlaganje stanica THC-u moglo bi imati citotoksične učinke, kao što su opisali Parolini i Binelli u svom radu.

Naime, Parolini i Binelli proveli su istraživanje utjecaja subletalnih koncentracija THC-a na školjke *Dreissena polymorpha*. Tretman je trajao 14 dana, a koristili su koncentracije  $0,05 \cdot 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,16 \text{ nM}$ ) i  $0,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $1,6 \text{ nM}$ ) THC-a. Tretman nižom koncentracijom nije rezultirao staničnim oštećenjima. Na kraju tretmana višom koncentracijom uočili su da je došlo do disbalansa aktivnosti antioksidacijskih enzima, povećanja peroksidacije lipida i karboksilacije proteina. Zaključili su da doza THC-a od  $0,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$  dovodi do narušavanja integriteta stanične membrane i gubitka strukturne i funkcionalne učinkovitosti proteina. Oštećenja stanica i toksičan učinak THC-a ovise o duljini tretmana te o upotrebnoj dozi (Parolini i Binelli, 2014).



**Slika 11.** Preživljenje staničnih linija Cal 27, Hep G2 i Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentraciji  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju 2, 4, 24 i 48 sati

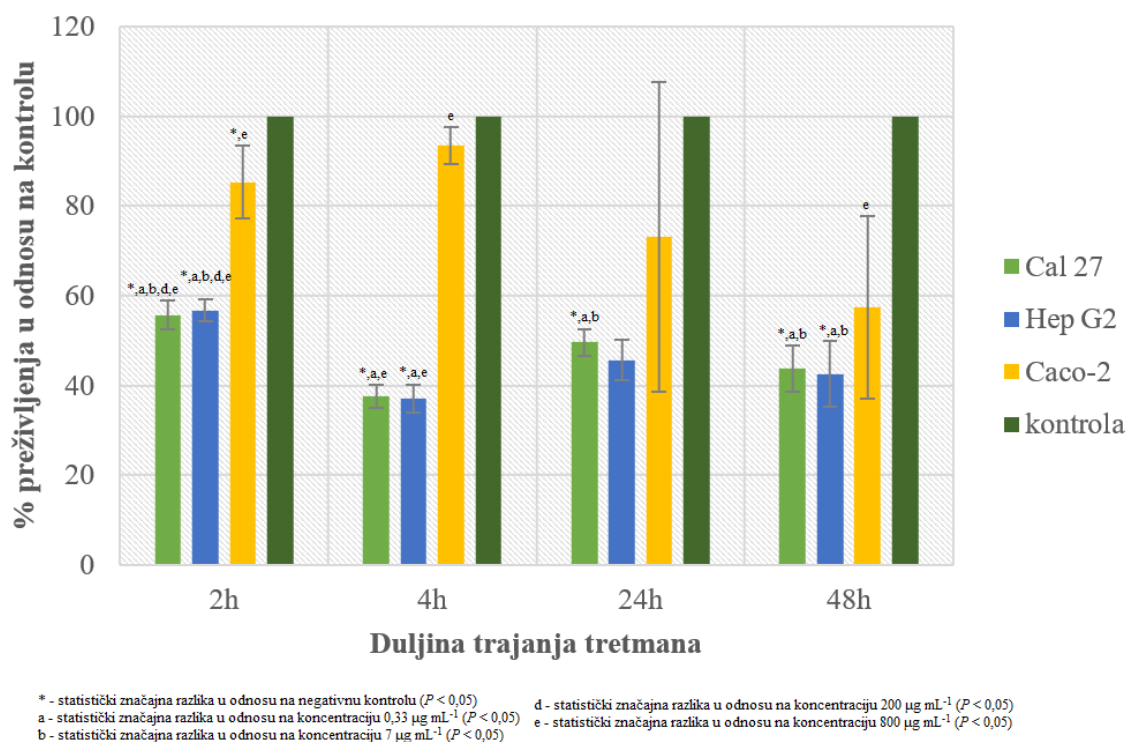
Na slici 11 prikazana je ovisnost preživljenja staničnih linija Cal 27, Hep G2 i Caco-2 o vremenu tretmana koncentracijom THC-a  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nakon tretiranja stanica otopinom THC-a u trajanju 4 sata javlja se statistički značajan pad preživljenja stanica Cal 27 i Hep G2, u odnosu na kontrolu. Citotoksičan učinak THC-a na ove stanice vidljiv je i nakon tretmana od 2 sata, što je bilo očekivano pošto se THC vrlo brzo nakon unosa počinje metabolizirati. Metabolizam THC-a kreće u jetri ako je unesen oralnim putem, a nakon toga slijedi i metabolizam u ostalim tkivima. Maksimalne se koncentracije THC-a u krvnoj plazmi postižu unutar prva 2 sata od konzumacije (Bruni i sur., 2018), što govori u prilog naglom padu preživljenja stanica Cal 27 i Hep G2. Međutim, daljnjim produljenjem trajanja tretmana, nakon 24 i 48 sati, stanice se kreću obnavljati i ponovo proliferirati.

Tretman otopinom THC-a u koncentraciji  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju 4 sata imao je najmanji utjecaj na preživljenje stanica Caco-2, iz čega se može zaključiti da THC ispoljava svoj citotoksičan učinak na ove stanice tek nakon prvotnog hepatičkog metabolizma. Otopina THC-a u koncentraciji  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , neovisno o vremenu, nema statistički značajan utjecaj na staničnu liniju Caco-2, ali pad preživljenja stanica također je primijećen tijekom tretmana u trajanju 2, 24 i 48 sati.

Scott i suradnici istraživali su utjecaj fitokanabinoida na stanice leukemije HL60 te su ispitivali citotoksičnost. Utvrdili su da je  $IC_{50}$  za staničnu liniju HL60 nakon 48 sati tretmana iznosio 13  $\mu M$  THC-a (što odgovara masenoj koncentraciji od 4,09  $\mu g mL^{-1}$ ). Također su utvrdili da kombinacijom kanabinoida  $IC_{50}$  pada, tj. da su potrebne manje koncentracije za citotoksičan učinak (Scott i sur., 2017).

Nakon 48 sati tretmana stanica THC-om koncentracije 7  $\mu g mL^{-1}$  došlo je do proliferacije stanica Cal 27 te Hep G2. Međutim, jasno se vidi citotoksičan učinak THC-a na staničnu liniju Caco-2 produljenjem vremena tretmana. THC se relativno brzo eliminira iz jetre, međutim uočeno je njegovo zadržavanje u masnim tkivima kroz dulji vremenski period. THC i njegovi metaboliti koncentriraju se u obliku konjugata masnih kiselina THC-a i kao 11-OH-THC, a izlučuju se niskom brzinom (Hall i sur., 2005). Uslijed toga dolazi do produljenog djelovanja THC-a na tkiva zadužena za ekskreciju THC-a, što potvrđuje pad preživljenja stanica Caco-2 ovisno o duljini vremena tretmana.

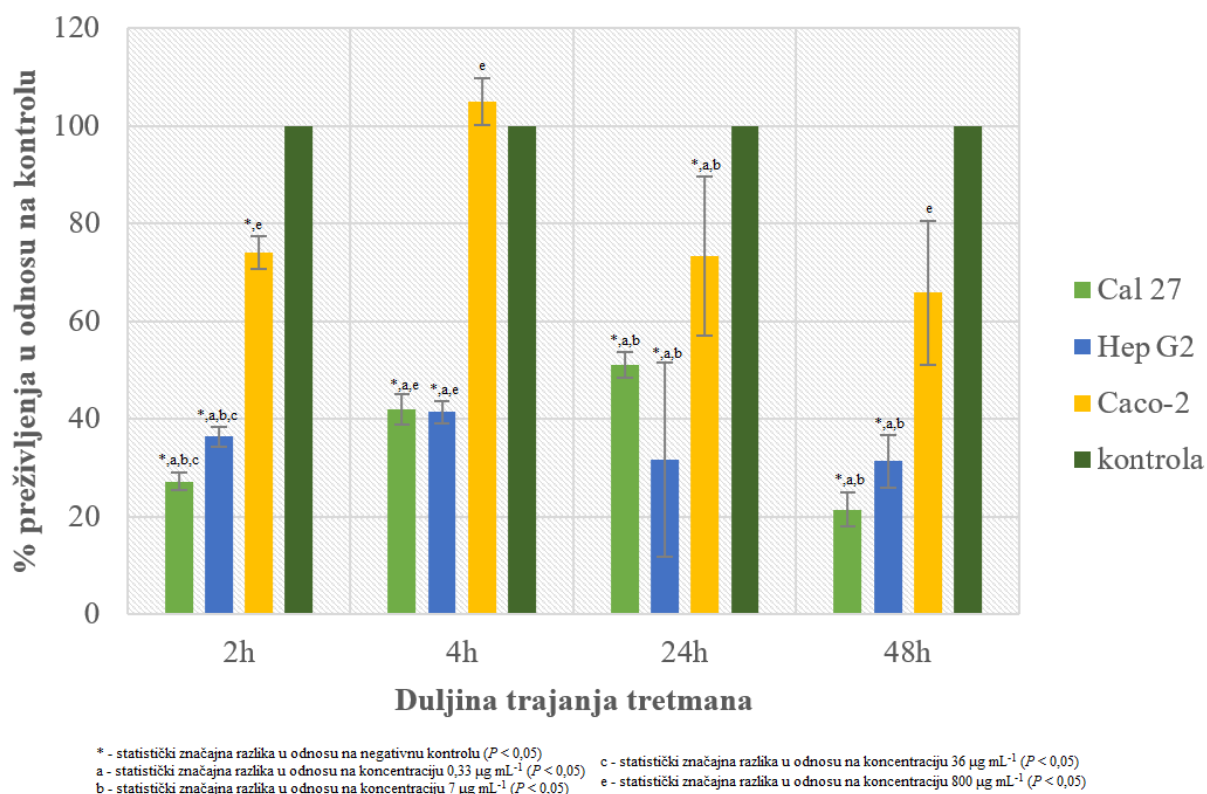




**Slika 12.** Preživljenje staničnih linija Cal 27, Hep G2 i Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentraciji  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju 2, 4, 24 i 48 sati

Iz slike 12 vidljivo je da tretiranje staničnih linija Cal 27, Hep G2 i Caco-2 otopinom THC-a u koncentraciji  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  značajno utječe na preživljenje stanica. Statistički značajno smanjenje preživljenja stanica svih staničnih linija u odnosu na kontrolu vidljivo je već nakon tretmana u trajanju 2 sata. Produljenjem tretmana na 4 sata, preživljenje stanica Cal 27 i Hep G2 značajno se smanjuje i u odnosu na tretman u trajanju 2 sata. Stanična linija Caco-2 se pokazala najotpornija na citotoksični učinak THC-a. Međutim, produljenjem vremena tretmana smanjuje se preživljenje i ove stanične linije, što govori u prilog kasnijem metabolizmu THC-a u crijevima.

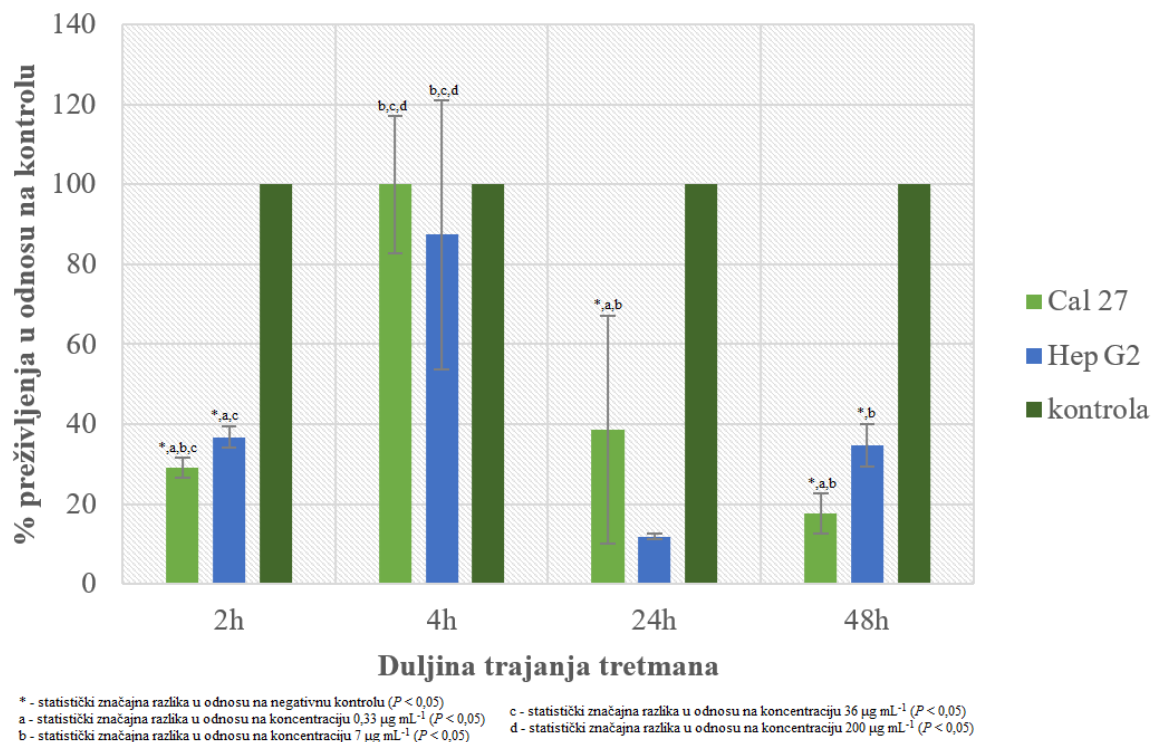
S obzirom na to da ova koncentracija izaziva značajan pad preživljenja svih staničnih linija već nakon kratkog vremena izloženosti stanica THC-u, možemo zaključiti da ona ima citotoksičan učinak.



**Slika 13.** Preživljenje staničnih linija Cal 27, Hep G2 i Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentraciji  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju 2, 4, 24 i 48 sati

Na slici 13 uočljivo je da tretman otopinom THC-a u koncentraciji  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  djeluje citotoksično prema svim ispitivanim staničnim linijama. Preživljenje staničnih linija Cal 27 i Hep G2 statistički se značajno smanjuje nakon 2, 4, 24 i 48 sati. Već nakon tretmana u trajanju 2 sata, preživljenje stanica Cal 27 iznosi svega 27,18 % u odnosu na kontrolu. Produljenjem vremena tretmana stanica, odnosno nakon tretiranja stanica u trajanju 4 i 24 sata, vidi se blago povećani postotak stanica, odnosno njihova proliferacija. Međutim, tretmanom otopinom THC-a u trajanju 48 sati, stanična linija Cal 27 pokazuje ponovni pad preživljenja. Za staničnu liniju Hep G2 uočen je sličan trend, s razlikom da nakon tretmana u trajanju 24 sata ne dolazi do proliferacije stanica, već njihovo preživljenje opada. Hep G2 stanice ne pokazuju dodatni pad preživljenja tretmanom duljim od 24 sata. Statistički značajno smanjenje preživljenja Caco-2 stanica vidljivo je već nakon 2 sata tretmana. Najveća citotoksičnost THC u koncentraciji  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  postignuta je nakon 24 satnog tretmana.

Ovi rezultati ukazuju na to da visoka koncentracija THC ima prvotni citotoksični učinak već nakon kraćeg vremena tretiranja stanica, odnosno nakon 2 sata tretmana, a učinak se povećava produljenjem vremena izlaganja stanica ovom spoju.



**Slika 14.** Preživljenje staničnih linija Cal 27 i Hep G2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentraciji  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju 2, 4, 24 i 48 sati

Na slici 14 prikazan je citotoksičan učinak THC-a u koncentraciji  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$  nakon 2, 4, 24 i 48 sati. Stanična linija Cal 27 pokazuje statistički značajno smanjenje preživljenja stanica, u odnosu na kontrolu, već nakon tretmana THC-om u trajanju 2 sata. Nakon 2 sata tretmana, preživljenje stanica Cal 27 iznosi 29,12 % u odnosu na kontrolu. Produljenjem tretmana na 4 sata naizgled dolazi do proliferacije stanica Cal 27, međutim analizom pod mikroskopom utvrđeno je da je THC djelovao citotoksično te da je broj preživjelih stanica zanemariv. Rezultat dobiven mjerenjem intenziteta obojenja stanica bojom Neutral red pomoću spektrofotometra može se protumačiti na način da se boja vezala na čestice samog THC-a, a ne za preživjele stanice. Tretmani u trajanju 24 i 48 sati pokazuju ponovni značajan pad preživljenja stanica Cal 27 stanične linije. Stanična linija Hep G2 pokazuje statistički značajno opadanje broja preživjelih stanica nakon tretmana u trajanju 2 sata, u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana u trajanju 4 sata, prema rezultatima dobivenim

spektrofotometrijom, izgleda da je došlo do proliferacije stanica. Međutim, baš kao što je slučaj i sa staničnom linijom Cal 27, na stanice Hep G2 ova koncentracija THC-a djelovala je citotoksično, a boja Neutral red vezala se na čestice THC-a. Mikroskopskom analizom je utvrđeno da je došlo do izrazitog smanjenja preživljenja stanica Hep G2 nakon tretmana THC-om u trajanju 4 sata, a ne do stanične proliferacije. Tretmanima u trajanju 24 sata i 48 sati jasno se vidi citotoksično djelovanje THC-a na staničnu liniju Hep G2, a pad preživljenja stanica statistički je značajan u odnosu na kontrolu nakon tretmana u trajanju 48 sati. Ova visoka doza THC-a uzrokovala je morfološke promjene Caco-2 stanica, što je utvrđeno mikroskopskom analizom pa ti rezultati nisu prikazani grafički.

Doza THC-a u koncentraciji  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$  već nakon 2 sata tretmana utjecala je na smanjenje broja preživjelih stanica svih staničnih linija. Došlo je do narušavanja integriteta stanične membrane i morfoloških izmjena stanica, te se boja Neutral red vjerojatno vezala za čestice THC-a koje su ostale u mrtvim stanicama. Prema navedenim podacima, može se zaključiti da je doza od  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$  svakako previsoka za terapijsku upotrebu THC-a zbog citotoksičnog učinka koji ima na stanice.

Rezultati dobiveni Neutral red testom upućuju na to da stanice Caco-2 linije pokazuju najveću otpornost prema djelovanju THC-a, dok su stanične linije Cal 27 i Hep G2 pokazale gotovo isti trend preživljenja stanica u ovisnosti o dozama THC-a. Sve stanične linije pokazuju povećanje citotoksičnog učinka THC-a s povećanjem njegove koncentracije te s povećanjem vremena izloženosti stanica otopini THC-a. Doza THC-a u najnižoj koncentraciji ( $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pokazuje statistički značajan citotoksični učinak već nakon tretmana u trajanju 2 sata, međutim s produljenjem vremena trajanja tretmana, stanice se oporavljaju te nastavljaju proliferirati. Pri visokim dozama ( $200$  i  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dolazi do očitije citotoksičnosti THC-a, a učinak je naročito vidljiv nakon 48 sati tretmana.

Koncentracije THC-a više od  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  dovode do citotoksičnog učinka koji se očituje smanjenjem preživljenja stanica, a Sarafian i suradnici došli su do sličnih zaključaka. Prema tome, možemo zaključiti da je koncentracija THC-a od  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  granična koncentracija za upotrebu u terapijske svrhe.

Sarafian i suradnici su istraživanjem na staničnoj liniji A549 adenokarcinoma pluća pokazali da THC djeluje citotoksično kod koncentracija većih od  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Oni su određivali citotoksičan učinak THC-a u ovisnosti o koncentraciji ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$  –  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) tijekom 24 sata. Uočili su da preživljenje stanica opada povišenjem koncentracije THC-a (Sarafian i sur., 2003).

#### 4.2. ODREĐIVANJE PROOKSIDATIVNOG UČINKA THC-a

Ispitivanje prooksidativnog učinka THC-a različitih koncentracija ( $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) provedeno je na staničnim linijama Cal 27, Hep G2 i Caco-2 DCFH-DA testom, opisanom u poglavlju 3.2.4. Prooksidativni učinak otopina THC-a ispitivan je u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati, nakon čega je određeno preživljenje i izračunata indukcija slobodnih radikala pojedine koncentracije u odnosu na negativnu kontrolu, tj. netretirane stanice.

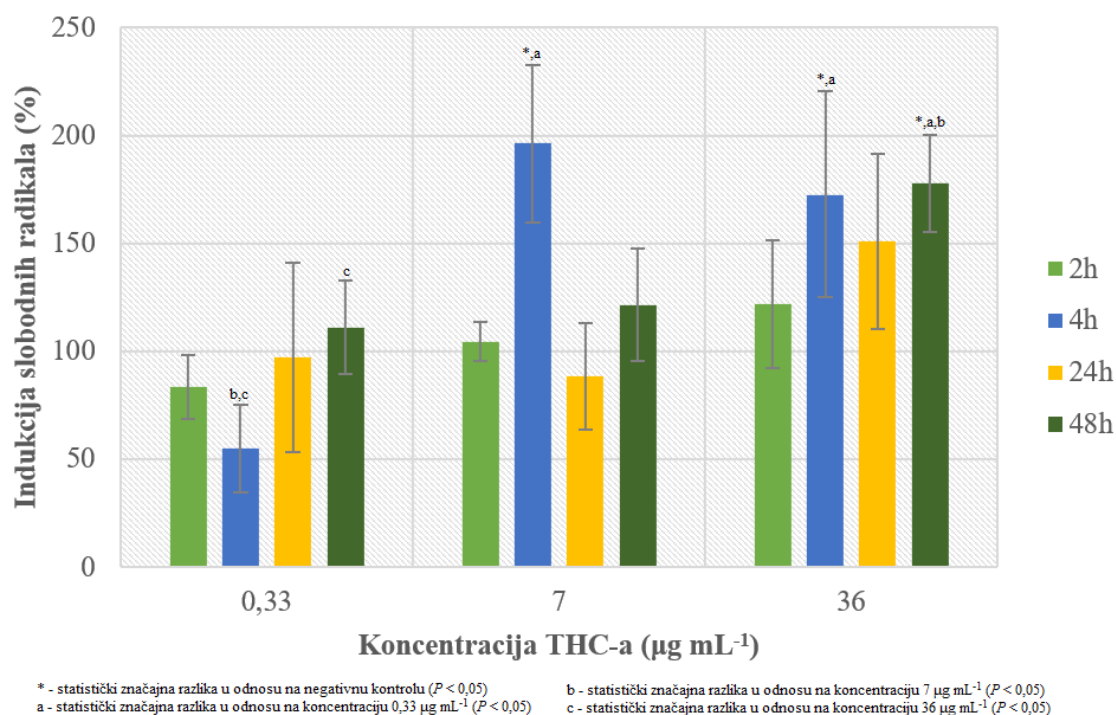
Rezultati su prikazani grafički kao ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentracijama THC-a.

Na slikama 15 – 17 prikazani su rezultati analize testa prooksidativnog učinka otopine THC-a pri koncentracijama  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati.

Ispitivanje prooksidativnog učinka provedeno je i kod koncentracija  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$  međutim ti rezultati nisu prikazani kako ne bi došlo do krivog tumačenja dobivenih rezultata. Naime, testom citotoksičnosti utvrđeno je da ove koncentracije dovode do narušavanja integriteta stanične membrane. Za provedbu DCF-DA neophodna je funkcionalna membrana kako bi se sama molekula DCF-DA mogla aktivirati. Pošto se integritet stanične membrane narušava kod upotrebe ovih koncentracija, molekula DCF-DA nije se mogla aktivirati i reagirati sa slobodnim radikalima u stanici, tako da u konačnici nije bilo fluorescentnog signala.

Tvari koji olakšavaju ili ubrzavaju oksidacijske procese u stanici imaju prooksidativan učinak. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) takve su tvari. Oni imaju važnu ulogu u procesu karcinogeneze zbog mutagenog i karcinogenog djelovanja. Povišene razine ROS-a narušavaju ravnotežu redoks reakcija, a to je slučaj u tumorskim stanicama. Molekule koje su prooksidansi također mogu djelovati kao selektivna citotoksična sredstva te postizanjem toksičnih razina ROS-a djelovati protiv tumorskih stanica (León-González i sur., 2015).

Dokazano je da THC može uzrokovati oksidativna oštećenja u *in vitro*, ali i u *in vivo* sustavima. Kao rezultat oksidativnog stresa dolazi do narušavanja stanične strukture i oksidacije makromolekula (DNK, lipida i enzimatskih proteina) (Pinto i sur., 2010; Parolini i Binelli, 2014).

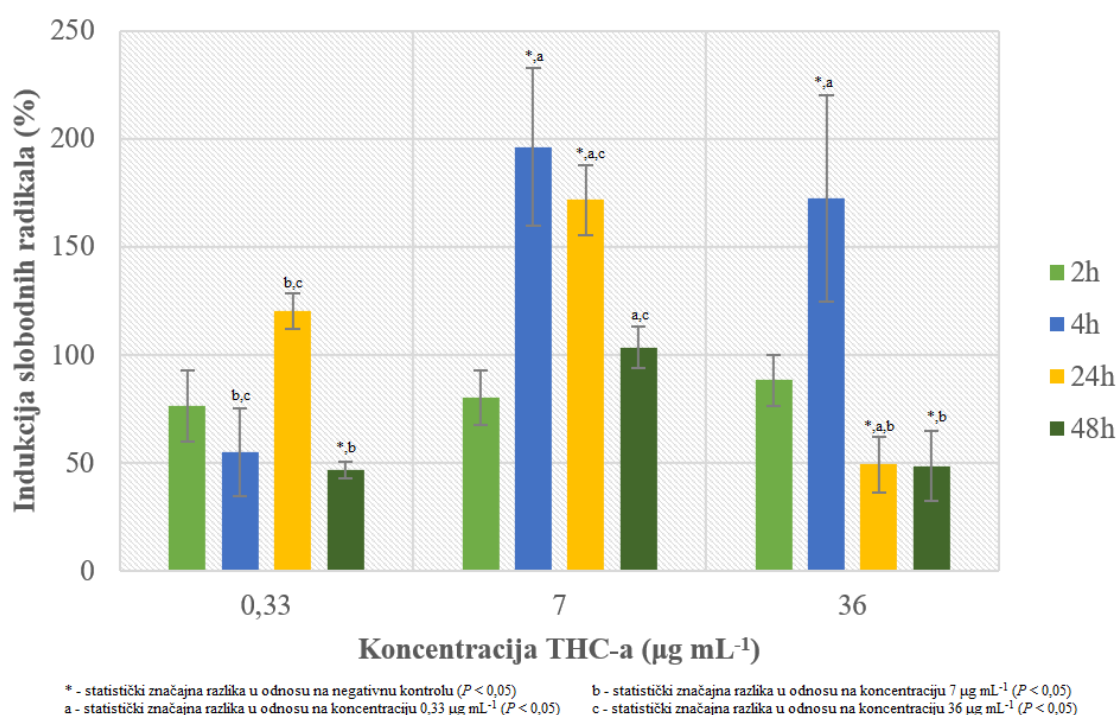


**Slika 15.** Indukcija slobodnih radikala na staničnoj liniji Cal 27 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Na slici 15 vidljivo je da tijekom 2 sata tretmana THC ne izaziva indukciju slobodnih radikala pri svim istraživanim koncentracijama. Produljenjem tretmana za 2 sata, koncentracije  $7$  i  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$  izazivaju prooksidativno djelovanje. Kod obrade rezultata dobivenih DCF-DA testom čini se da dvije najviše istraživane koncentracije ( $200$  i  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nemaju značajan prooksidativan učinak na stanice Cal 27. No, kod tumačenja rezultata indukcije ROS-a dobivenih nakon tretmana stanica s koncentracijama THC-a koje su toksične treba biti oprezan. Prema grafičkom prikazu činilo bi se da THC nema prooksidacijsko djelovanje, već da upravo suprotno, smanjuje bazalnu razinu slobodnih radikala te iz tog razloga navedeni rezultati nisu prikazani. Treba voditi računa o tome da su se te dvije koncentracije pokazale izrazito toksičnima te je integritet stanične membrane narušen.

Stanična membrana najosjetljivija je na napad slobodnim radikalima, što dovodi do narušavanja njene integracije i lipidne peroksidacije. To u konačnici rezultira oksidativnim stresom koji predstavlja neravnotežu između stvaranja slobodnih radikala i njihovog uklanjanja obrambenim antioksidacijskim sustavima stanice (Valko i sur., 2016).

Za aktivaciju molekule DCF-DA neophodna je funkcionalna membrana i aktivnost esteraza, a ako dođe do narušavanja funkcije membrane sama molekula DCF-DA neće biti aktivirana i reakcija sa slobodnim radikalima u stanici neće rezultirati fluorescentnim signalom. Nakon 24 i 48 sati tretmana ne detektiraju se povišene razine slobodnih radikala u stanicama što upućuje na činjenicu da netoksične koncentracije THC u stanicama ne izazvaju oksidacijski stres te da je došlo do neutralizacije radikala nastalih u prvim satima izlaganja stanica THC-u. Koncentracija od 36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  izazvala je indukciju slobodnih radikala nakon 48 sati tretmana.



**Slika 16.** Indukcija slobodnih radikala na staničnoj liniji Hep G2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i 36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Na Slici 16 prikazani su rezultati indukcije slobodnih radikala nakon tretmana stanične linije Hep G2 s različitim koncentracijama THC-a. Netoksične koncentracije (0,33 i 7  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ne izazivaju indukciju slobodnih radikala u prva dva sata inkubacije, dok se produljenjem vremena inkubacije vidi da koncentracije od 7 i 36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  izazivaju indukciju radikala. Nakon 24 i 48 sati inkubacije s koncentracijom 7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  vidi se da je i dalje prisutna povećana razina ROS-ova, što upućuje na zaključak da u ovim metabolički aktivnim

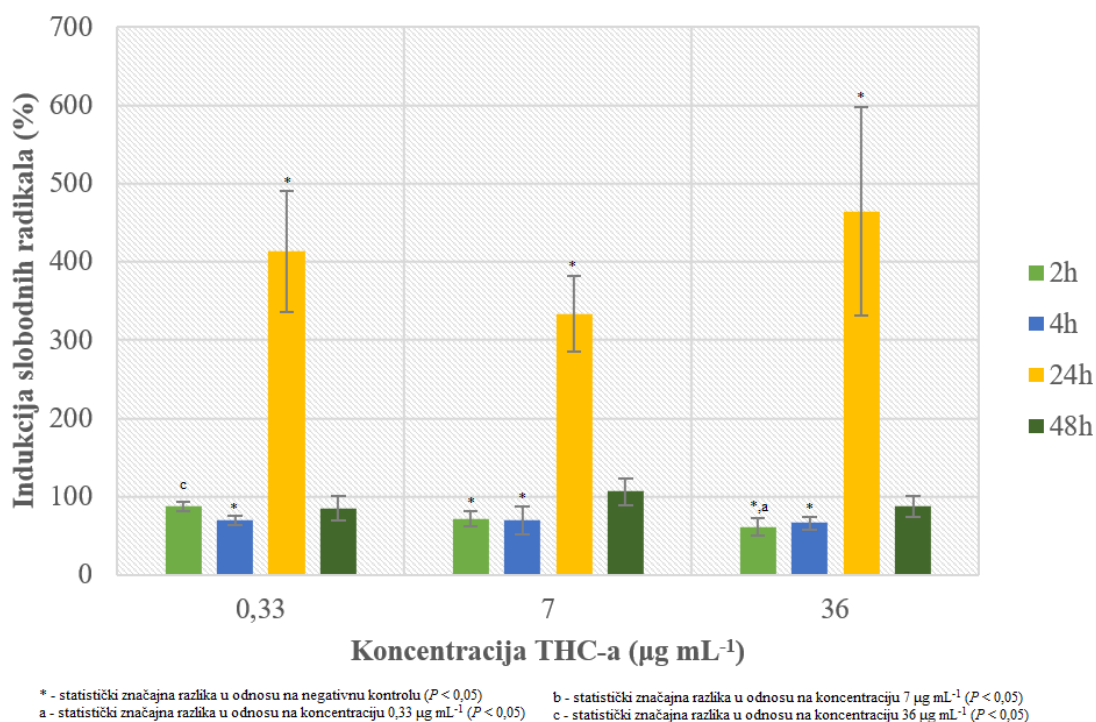
stanicama slobodni radikali kontinuirano nastaju, vjerojatno zbog intenzivnog metabolizma THC-a. THC unesen oralnim putem administracije brzo se metabolizira stanicama jetre, do metabolita 11-hidroksi-tetrahidrokanabinola (Pinto i sur., 2010). Ukoliko je put unosa drugačiji (inhalacijom, transdermalnim ili transmukozalnim putem) izbjegava se prvotni hepatički metabolizam, međutim THC prolazi metabolizam jetrenim enzimima nakon distribucije (Abrams i Guzman, 2015).

Pinto i suradnici ispitivali su učinak THC-a na jetru miševa uslijed kroničnog unosa. Miševi su dobivali 2 injekcije  $\Delta^9$ -THC-a (ukupne dnevne doze od 10 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase) tijekom 10 dana. Mjerili su razine biomarkera oksidativnog stresa te učinke slobodnih kisikovih radikala na lipide, proteine i DNK u jetri. Zaključili su da kroničan unos ove doze THC-a (koja odgovara masenoj koncentraciji od 10 µg mL<sup>-1</sup>) ne dovodi do značajne indukcije slobodnih radikala u ovisnosti o vremenu te nije došlo do oštećenja jetre (Pinto i sur., 2010).

U stanicama tretiranim koncentracijama THC-a za koje je dokazano citotoksično djelovanje u prethodnim eksperimentima (200 i 800 µg mL<sup>-1</sup>) naizgled se čini da nije došlo do indukcije slobodnih radikala, no to je posljedica ograničenja same metode jer u ovim stanicama integritet membrane nije očuvan pa tako nije ni došlo do aktivacije molekule DCF-DA. Može se zaključiti da je vrijeme potrebno za indukciju slobodnih radikala 4 sata, te da nakon 2 sata tretmana ne dolazi do indukcije slobodnih radikala.

Najniža i netoksična koncentracija, 0,33 µg mL<sup>-1</sup> odgovara koncentraciji THC-a u dronabinolu, lijeku na bazi kanabisa koji se upotrebljava za liječenje simptoma uzrokovanih kemoterapijom te multiple skleroze (Abrams i Guzman, 2015; Schimrigk i sur., 2017). Ta koncentracija nije pokazala niti prooksidativno djelovanje.





**Slika 17.** Indukcija slobodnih radikala na staničnoj liniji Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup>, 7 µg mL<sup>-1</sup> i 36 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Caco-2 stanice pokazale su se kao najotpornije na citotoksično djelovanje THC-a. Na slici 17 prikazana je indukcija slobodnih radikala nakon tretmana THC-om u različitim koncentracijama i pri različitim vremenima tretmana. Iz ovog je prikaza vidljivo da nakon 2 i 4 sata ne dolazi do indukcije slobodnih radikala, dok nakon 24 sata sve koncentracije djeluju prooksidativno. Nakon 48 sati, razina radikala odgovara bazalnoj razini, upućujući na činjenicu da je došlo do aktivacije antioksidacijskog sustava stanice i neutralizacije nastalih radikala. Kao i u prethodnim slučajevima, kod najviših, toksičnih koncentracija došlo je do gubitka staničnog integriteta uslijed citotoksičnog djelovanja THC-a te se iz rezultata dobivenih DCF-DA testom o prooksidativnom djelovanju ovog spoja ne može zaključiti sa sigurnošću.

Iz dobivenih rezultata je uočljivo da je stanična linija Cal 27 najmanje otporna na prooksidativni učinak THC, dok se stanična linija Caco-2 pokazala kao najotpornija. Na staničnu liniju Hep G2 THC iskazuje najveći prooksidativan učinak nakon tretmana koncentracijama  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ , u trajanju 4 i 24 sata. Kod stanične linije Caco-2 prooksidativan učinak uočljiv je nakon tretmana u trajanju 24 sata.

Dobiveni rezultati upućuju na sam metabolički put THC-a, odnosno da je njegov učinak najznačajniji na samom mjestu apsorpcije, odnosno u ustima. Hepatički metabolizam THC-a je izrazito opsežan, a to pokazuju i učinci THC-a nakon tretmana u trajanju 4 sata i 24 sata. Nakon metabolizma jetrom, THC se metabolizira i u ostalim tkivima, pa tako i u debelom crijevu, što je vidljivo učinkom THC-a nakon tretmana u trajanju 24 sata.

Nakon što se THC metabolizira u aktivnim tkivima, njegovi se metaboliti akumuliraju u jetri i skladište u stanicama masnog tkiva (Kopjar i sur., 2019). Međutim, sam je metabolizam u većini tkiva spor, a poluživot THC-a ovisi o brzini oslobađanja kanabinoida iz tkiva te njihovom naknadnom metabolizmu. Poluživot THC-a i njegovih metabolita varira između 20 sati pa sve do 10 – 13 dana (Carter i sur., 2004).

Prema tome, možemo zaključiti da na sposobnost THC-a da inducira slobodne radikale utječe vrijeme izloženosti ovom spoju, kao i upotrebljena doza. S povećanjem koncentracije THC-a te produljenjem tretmana stanica, raste i njegov prooksidativan učinak.

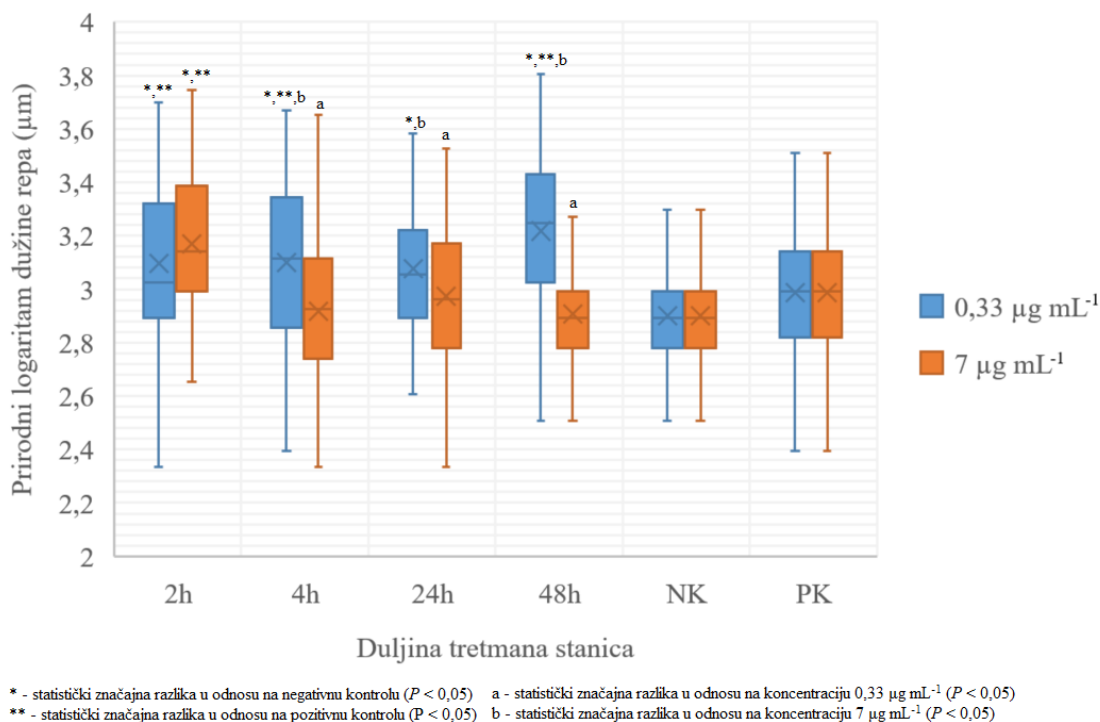
#### 4.3. ODREĐIVANJE OŠTEĆENJA DNK IZAZVANIH OTOPINOM THC-a

Ispitivanje genotoksičnog učinka otopina THC-a različitih koncentracija, provedeno je u vremenu izloženosti stanica od 2, 4, 24 i 48 sati na staničnim linijama Cal 27, Hep G2 i Caco-2 komet testom, opisanim poglavljem 3.2.5., Razina primarnih oštećenja DNK mjerena je pomoću programa za analizu slike Comet Assay II, pri čemu su kao parametri za procjenu oštećenja korišteni dužina repa kometa, intenzitet repa i repni moment kometa.

Prilikom testa određivanja oštećenja genetičkog materijala istraživane su netoksične, odnosno subtoksične koncentracije THC-a ( $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) s obzirom da toksične koncentracije značajno narušavaju integritet stanica i onemogućavaju pravilno provođenje komet testa (Anderson i sur., 1998; Singh i sur., 1988).

Rasipanje rezultata bilo je značajno zbog razlika u izgledu i osobitosti pojedinog kometa, te su iz tog razloga rezultati normalizirani određivanjem prirodnog logaritma i zbrojenog s brojem 2. Rezultati su prikazani grafički, slikama 18, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 28 i 29 kao ovisnost dužine repa, intenziteta repa i repnog momenta o koncentracijama THC-a. Slikama 21, 25, 27 i 30 prikazan je izgled kometa stanica vidljiv pod mikroskopom.

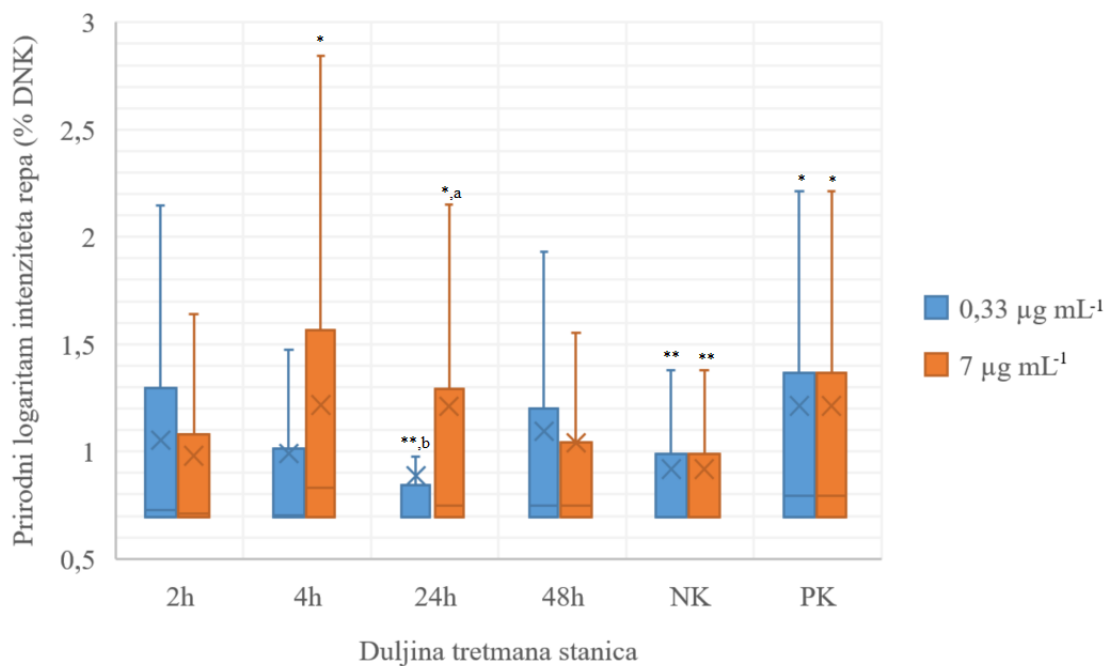
Komet testom utvrđuju se razine oštećenja molekule DNK mjerenjem razine DNK koja iz jezgre stanice (glave kometa) prelazi u rep kometa. Što je veći postotak DNK prešao u rep kometa, tj. što je rep kometa dulji i što je intenzitet repa veći, ukazuje da je došlo do većih oštećenja genetskog materijala stanice. Kao prihvatljiva razina oštećenja smatraju se vrijednosti do 10 % DNK u repu kometa (Collins i sur., 2008).



**Slika 18.** Dužina repa kometa genetičkog materijala Cal 27 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Iz slike 18 vidljivo je da THC u koncentraciji 0,33 µg mL<sup>-1</sup> već nakon 2 sata tretmana dovodi do produljenja repa kometa Cal 27. Taj se, genotoksičan učinak povećava u ovisnosti o vremenu trajanja tretmana stanica te je on statistički značajan u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolu. Međutim, povećanje koncentracije THC-a ne dovodi do većih genetičkih oštećenja. Naime, iz grafa se čini da genotoksičan učinak tretmana THC-om u koncentraciji 7 µg mL<sup>-1</sup> opada u ovisnosti o vremenu tretiranja stanica. Ali, doza od 7 µg mL<sup>-1</sup> ima toksičan učinak na stanice, što pokazuju rezultati dobiveni testom citotoksičnosti. Naime, već nakon tretmana u trajanju 2 sata, postotak preživljenja stanica Cal 27 je 76,58 % u odnosu na negativnu kontrolu, a nakon 4 sata preživljenje stanica je svega 49,02 % u odnosu na netretirane stanice (slika 11).

Smanjenje dužine repa kometa nakon tretmana stanica Cal 27 ovom koncentracijom THC-a možemo objasniti kao posljedicu proliferacije stanica koje su preživjele prvotni genotoksični učinak THC-a. Prema tome, ovi podaci upućuju na genotoksičnost THC-a koncentracije 7 µg mL<sup>-1</sup> jer je tijekom produljenja vremena tretmana stanica došlo do razvitka mutiranih stanica koje su proliferirale.

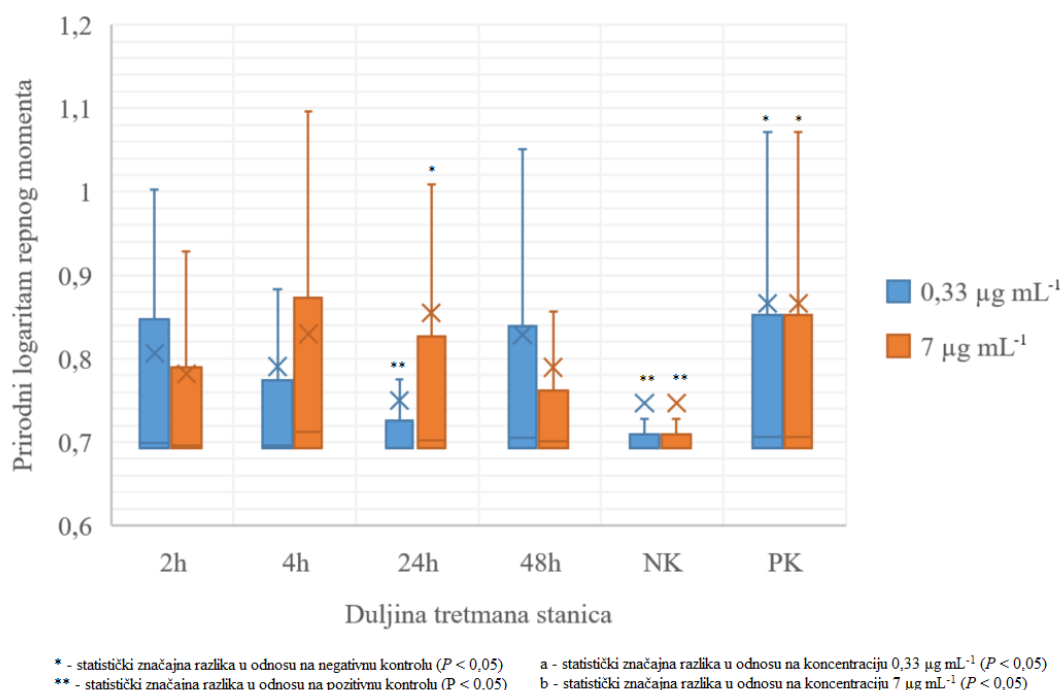


\* - statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ( $P < 0,05$ )      a - statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,33 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )  
 \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu ( $P < 0,05$ )      b - statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 7 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

**Slika 19.** Intenzitet repa kometa genetičkog materijala Cal 27 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Iz slike 19 vidljivo je da % DNK u repu kometa ovisi o dozi THC-a te se, sukladno tome, intenzitet repa povećava s povećanjem koncentracije THC-a. Statistički značajno povećanje intenziteta repa, u odnosu na negativnu kontrolu, vidljivo je nakon tretmana stanica THC-om koncentracije 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju 4 sata. Nakon 24 sata tretmana stanica THC-om opada njegov genotoksičan učinak. Međutim, intenzitet repa kometa genetičkog materijala nakon tretmana THC-om u koncentraciji 7 µg mL<sup>-1</sup> i dalje je statistički značajan u odnosu na negativnu kontrolu. Daljnjim produljenjem tretmana na 48 sati, THC više ne ispoljava genotoksičan učinak te dolazi do proliferacije onih stanica koje su preživjele njegov prvotni učinak.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da do povećanja % DNK u repu kometa genetičkog materijala stanične linije Cal 27 dolazi povećanjem koncentracije otopine THC-a te produljenjem vremena trajanja izloženosti stanica THC-u. Smanjenje intenziteta repa kometa nakon 48 sati tretmana stanica THC-om može se pripisati proliferaciji stanica koja je utvrđena testom citotoksičnosti. Naime, THC se nakon što je apsorbiran brzo distribuira krvnom plazmom do metabolički aktivnih i dobro prokrvljenih tkiva i organa poput pluća, srca, jetre i mozga (Huestis, 2007) što govori u prilog značajnom utjecaju THC-a na povećanje % DNK u repu kometa kod kratkog vremena tretmana stanica Cal 27.

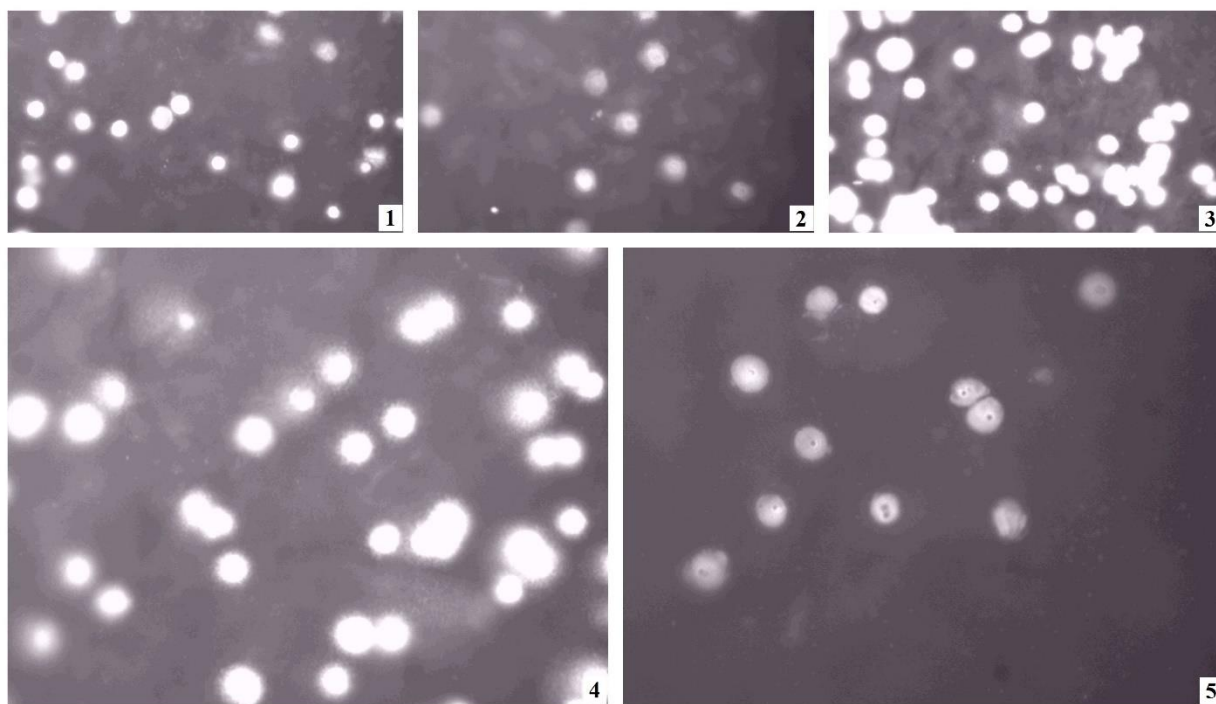


**Slika 20.** Repni moment genetičkog materijala Cal 27 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Repni moment objedinjuje % DNK koji se nalazi u repu kometa te dužinu samog repa kometa. Prema tome, vidljivo je da tretman otopinom THC-a nakon 2 i 4 sata ne izaziva statistički značajna oštećenja genetičkog materijala u odnosu na negativnu kontrolu. Usporedbom oštećenja DNK s pozitivnom kontrolom, tj. tretmanom vodikovim peroksidom, vidljivo je da otopine THC-a tijekom 2 i 4 sata izazivaju manje oštećenja genetičkog materijala Cal 27 stanične linije, u cijelom ispitivanom koncentracijskom rasponu (slika 20).

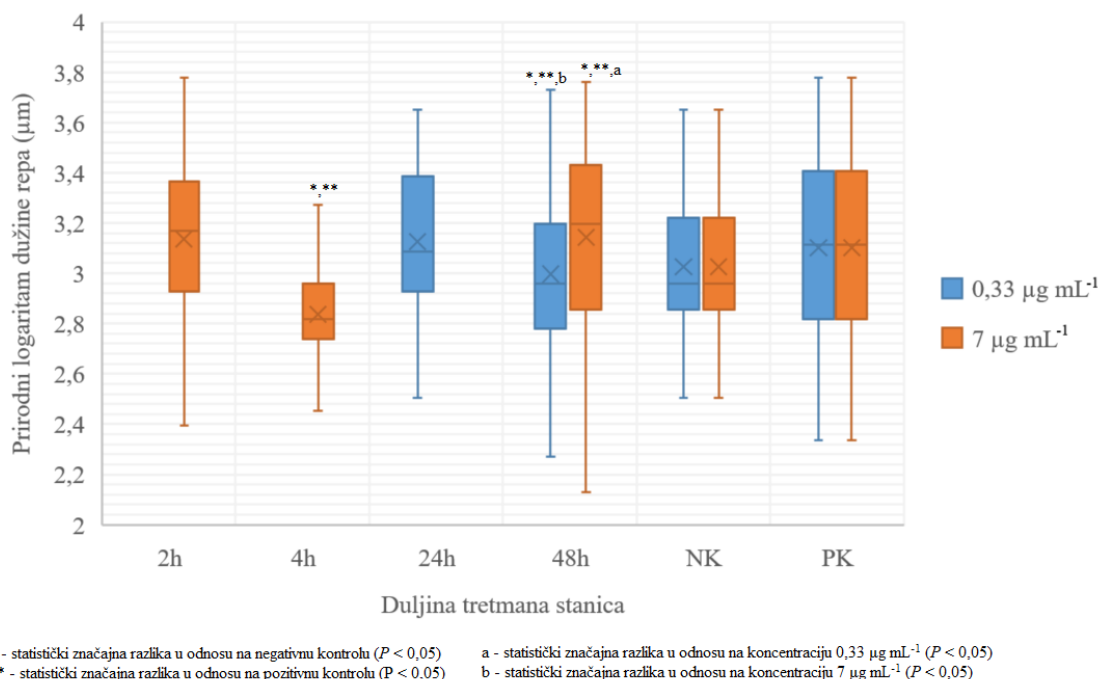
THC dovodi do većih genotoksičnih učinaka produljenjem vremena tretmana stanica već pri niskoj koncentraciji od 0,33 µg mL<sup>-1</sup>. Veća koncentracija THC-a dovodi do značajnijih genotoksičnih učinaka. Produljenjem vremena tretmana stanica naizgled dolazi do njihove proliferacije nakon tretmana nižom koncentracijom, međutim u tom se slučaju radi o stanicama koje su mutirale i tako preživjele prvotni učinak THC-a. Koncentracija 7 µg mL<sup>-1</sup> uzrokuje veće genotoksične učinke te djeluje citotoksično. S obzirom da je samo mali broj stanica preživio učinke THC-a, duljim tretmanom stanica Cal 27 neće doći do proliferacije preživjelih stanica.

THC se najčešće konzumira oralnim putem, u obliku ulja ili tableta, ili pak inhalacijom (Grotenhermen, 2003). Sama apsorpcija THC-a ovisi o individualnim razlikama u epitelnim stanicama jezika, ali i čimbenicima poput prehrane te jačine i dinamike inhalacije (Huestis, 2007).



**Slika 21.** Genetički materijal stanične linije Cal 27 nakon 2 sata tretmana koncentracijom  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  (1), nakon 2 sata tretmana koncentracijom  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  (2) te nakon 48 sati tretmana koncentracijom  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  (3) i usporedba s negativnom (4) i pozitivnom kontrolom (5)

Iz prikaza slike 21 može se vidjeti genotoksičan učinak THC-a na Cal 27 u ovisnosti o korištenoj koncentraciji i vremenu duljine tretmana. Nakon 2 sata tretmana nižom koncentracijom, genetički materijal sličnog je izgleda kao negativna kontrola te možemo zaključiti da nije došlo do genotoksičnog učinka. Međutim, već samo povećanje koncentracije THC-a dovodi do značajnih promjena u izgledu kometa. Vidljivo je da je nakon 2 sata tretmana THC-om koncentracije  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  došlo do razaranja genetičkog materijala stanica. Ukoliko usporedimo rezultate dobivene analizom i sam izgled kometa, možemo zaključiti da su oni nesuglasni. Naime, prilikom probira kometa za analizu potrebno je izabrati one kod kojih genetički materijal nije potpuno uništen. To je mogući razlog ovom nesuglasju rezultata. Nakon 48 sati tretiranja stanica THC-om također dolazi do izmjena u izgledu njihovih kometa. Genetički materijal stanica je zbijeniji, a neki su kometi čak sljubljeni zajedno te u tom slučaju nije bilo moguće odrediti gdje jedan komet završava, a drugi počinje, što je također utjecalo na njihov probir kometa potrebnih za analizu. Također, neki kometi djeluju napuhnuto, što upućuje na zaključak da je došlo do nekroze stanica, a slični rezultati vidljivi su kod duljih vremena tretmana ostalih staničnih linija (slika 30).



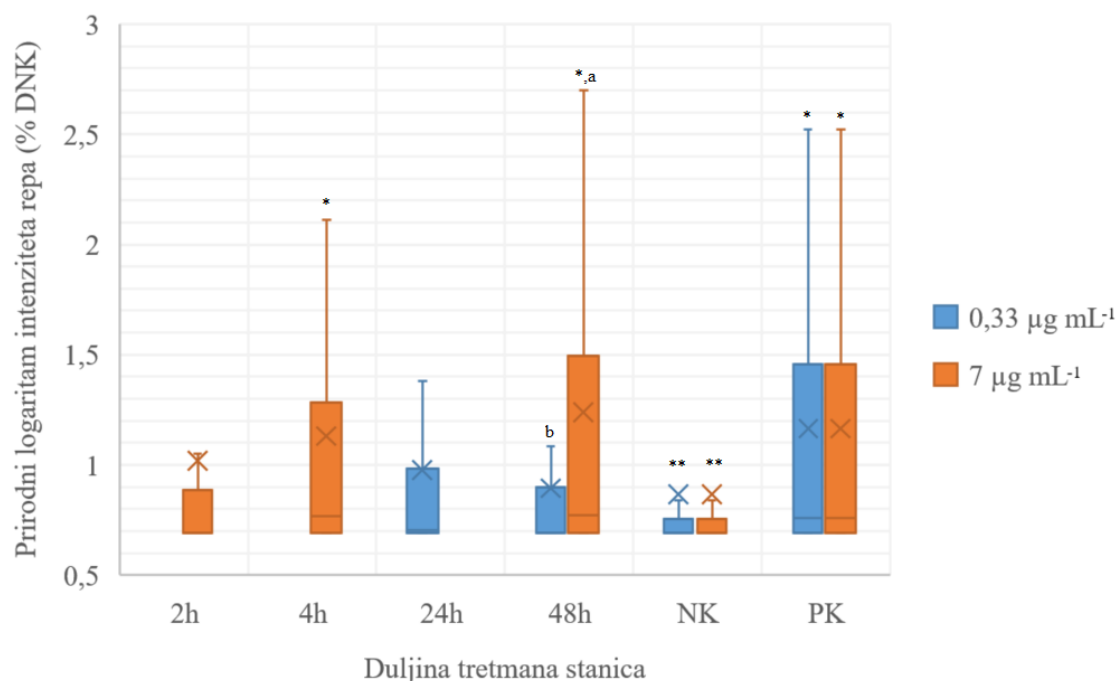
**Slika 22.** Dužina repa kometa genetičkog materijala Hep G2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Na slici 22 prikazan je učinak THC-a na produženje repa kometa stanične linije Hep G2 ovisno o duljini tretmana stanica. Niska koncentracija THC-a (0,33 µg mL<sup>-1</sup>) dovela je do značajnih oštećenja stanica već pri kratkim vremenima tretmana. Analizom pod mikroskopom utvrđeno je da je došlo do značajnih promjena u integritetu i morfologiji kometa te ih nije bilo dovoljno za provedbu analize, kao što je vidljivo iz slike 25.

Tretman stanica od 24 sata doveo je do morfoloških promjena izgleda kometa uočenih analizom pod mikroskopom, neovisno o koncentraciji THC-a. Većina genetičkog materijala bila je uništena. Vidjelo se da je genetički materijal stanica raspršen, osobito kod više koncentracije, te nije bilo mogućnosti izbrojati takve komete. Veća koncentracija THC-a pokazuje ovisnost genotoksičnog učinka o duljini vremena tretmana stanica. Do sličnog zaključka došli su Lucić Vrdoljak i suradnici.

Lucić Vrdoljak i suradnici proveli su *in vivo* istraživanje na miševima kojim su ispitivali genotoksične učinke irinotekana i THC-a te njihove kombinacije. Istraživanje je trajalo 7 dana, a miševi su svakodnevno primali dozu THC-a od 7 µg mL<sup>-1</sup>. Došli su do zaključka da produljenjem tretmana s THC-om dolazi do povećanja srednje vrijednosti duljine repa kometa, a samim time i do većeg genotoksičnog učinka THC-a na hepatocite (Lucić Vrdoljak i sur., 2018).





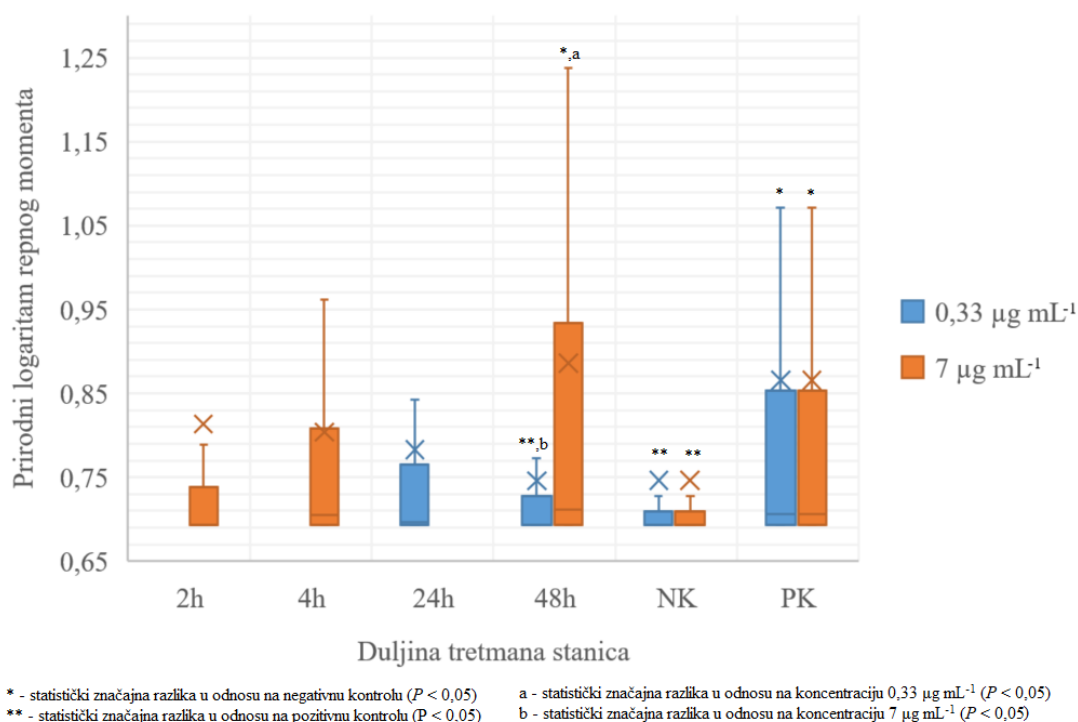
\* - statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu ( $P < 0,05$ )    a - statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 0,33 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )  
 \*\* - statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu ( $P < 0,05$ )    b - statistički značajna razlika u odnosu na koncentraciju 7 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ )

**Slika 23.** Intenzitet repa kometa genetičkog materijala Hep G2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Tretiranje stanica Hep G2 THC-om u koncentraciji 7 µg mL<sup>-1</sup> pokazuje vremensku ovisnost o povećanju % DNK u repu kometa. Intenzitet repa kometa smatra se najkorisnijim parametrom za određivanje stope oštećenja DNK putem komet testa. On ukazuje na količinu DNK koja je migrirala u rep kometa i korelira s učestalošću lomova DNK (Kopjar i sur., 2019).

Tretmani dulji od 2 sata pokazuju statistički značajno povećanje intenziteta repa kometa u odnosu na negativnu kontrolu. Pozitivnom se kontrolom pak postižu oštećenja stanica koja dovode do promjene integriteta stanične membrane i stanične smrti. Kao pozitivna kontrola poslužila je otopina vodikova peroksida za koji je dokazano da ima citotoksičan učinak i dovodi do apoptoze i nekroze stanica (Mahaseth i Kuzminov, 2017; Whittemore i sur., 1995). Nakon tretmana stanica 48 sati, intenzitet repa kometa veći je čak i od pozitivne kontrole. Prema tome, možemo zaključiti da THC u koncentraciji od 7 µg mL<sup>-1</sup> izaziva genotoksične promjene stanica iz linije Hep G2. Niža koncentracija THC-a ne dovodi do značajnih promjena u intenzitetu repa kometa. Međutim, nakon kraćih vremena tretmana, većina genetičkog materijala Hep G2 bila je uništena. To možemo pripisati činjenici da THC

brzo nakon apsorpcije prolazi opširan hepatocelularni metabolizam (Abrams i Guzman, 2015).



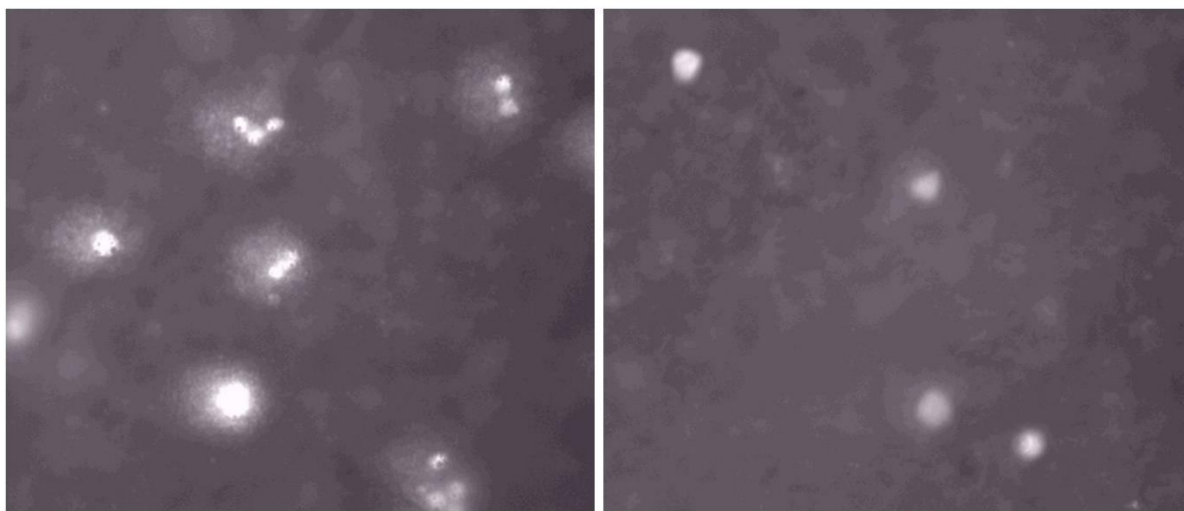
**Slika 24.** Repni moment genetičkog materijala Hep G2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Iz slike 24 vidljivo je da se genotoksičan učinak više koncentracije THC-a povećava kako se produljuje vrijeme izloženosti stanica THC-u. Nakon 48 sati tretmana stanica THC-om koncentracije 7 µg mL<sup>-1</sup> repni moment kometa je statistički značajno veći u odnosu na negativnu kontrolu. Tretman stanica nižom koncentracijom THC-a pokazao se kao bolji izbor. Nakon prvotnog genotoksičnog i citotoksičnog učinka ove niske koncentracije THC-a na stanice, dolazi do smanjenja repnog momenta kometa produženjem vremena tretmana stanica.

Prema tome možemo zaključiti da THC ima značajan prvotni učinak na stanice jetre. Razlog tomu je hepatički metabolizam koji THC prolazi nakon apsorpcije oralnim putem (Abrams i Guzman, 2015). Nakon metabolizma THC-a, njegovi se metaboliti akumuliraju u hepatocitima i nakupljaju u masnim tkivima zbog njihove lipofilne prirode. Njihova je eliminacija spora, a također prolaze enterohepatičku recirkulaciju čime imaju dugotrajan učinak na stanice jetre (Kopjar i sur., 2019). Time potvrđujemo rezultate dobivene nakon

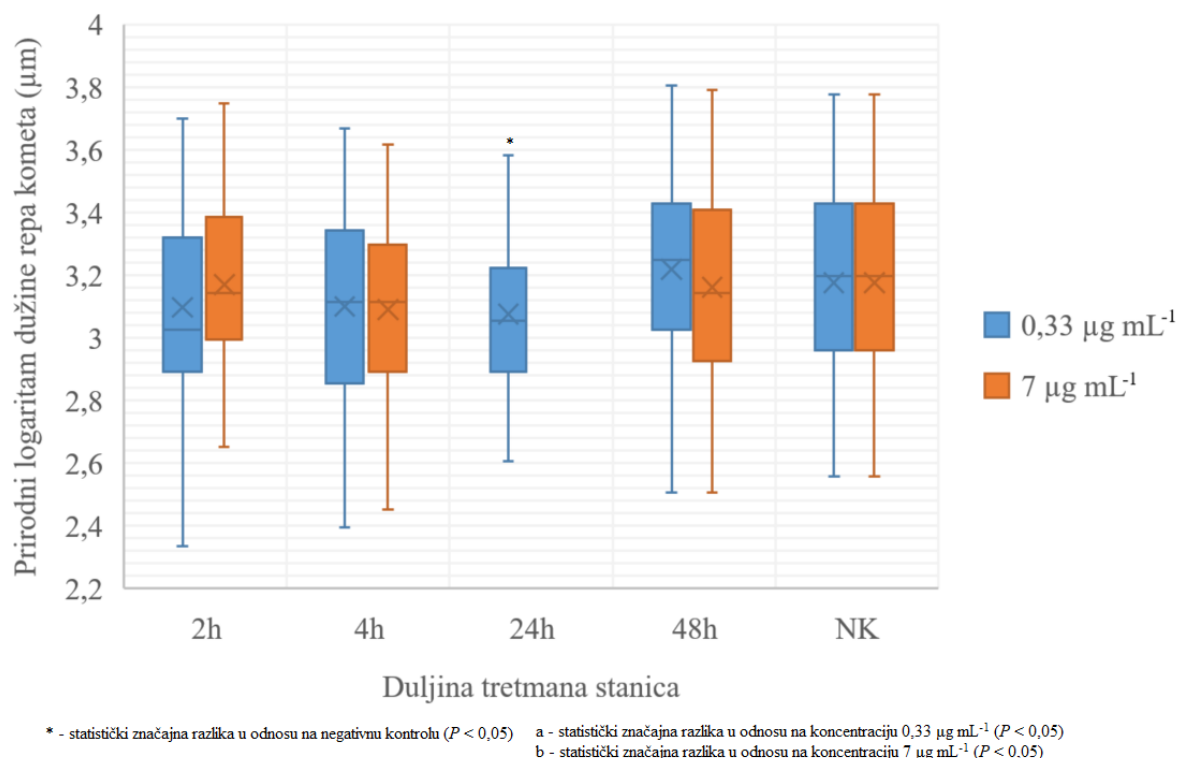
tretmana stanica viškom koncentracijom THC-a koja je uzrokovala značajan genotoksičan učinak nakon 48 sati tretmana.

Stanice Hep G2 pokazale su se najosjetljivije na tretman otopinom THC-a u trajanju 2 sata te je došlo do oštećenja genetičkog materijala vidljivog pod mikroskopom. Genetički materijal stanične linije Hep G2 bio je oštećen u tolikom postotku da možemo zaključiti da je došlo do apoptoze i nekroze stanica, kao što je vidljivo iz slike 25.



**Slika 25.** Genetički materijal stanica Hep G2 nakon tretmana otopinom THC-a koncentracije  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju 2 sata (lijeva slika) i 4 sata (desna slika).

Maglaste pojave oko stanica ukazuju na fragmente DNK koji su se pod djelovanjem istosmjerne struje zbog manje mase i veće gibljivosti gelom počeli odvajati od glavne jezgre, tj. od glave kometa. S povećanjem „maglice“ oko kometa, povećava se i udio genetičkih oštećenja stanica. Količina fragmenata DNK izravno je proporcionalna udjelu oštećenja genetičkog materijala stanica. Povećanjem količine fragmenata DNK povećava se i genotoksičan učinak.

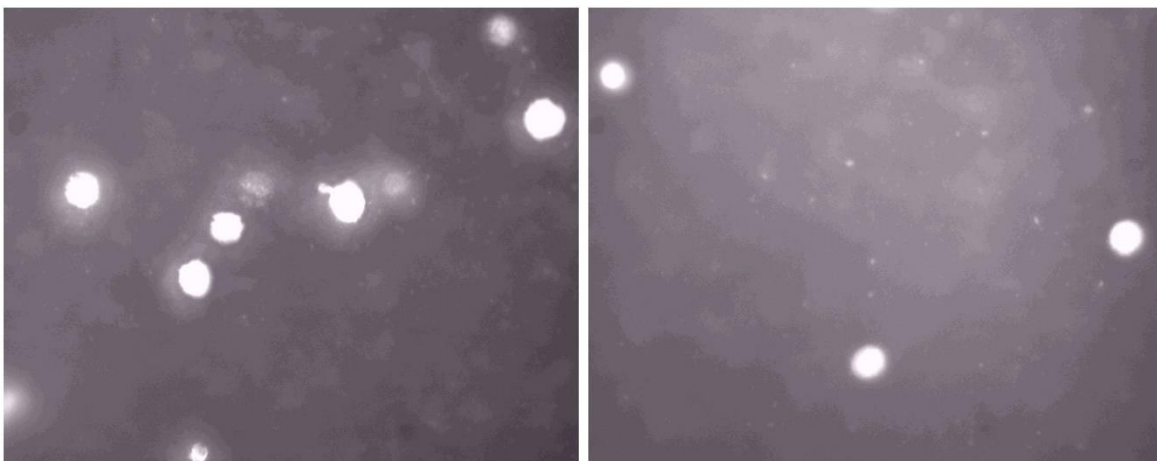


**Slika 26.** Dužina repa kometa genetičkog materijala Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Utjecaj THC-a na staničnu liniju Caco-2 nema značajan genotoksičan učinak, tj. ne dolazi do oštećenja genetičkog materijala nakon tretmana u trajanju 2 ili 4 sata, prilikom upotrebe otopine THC-a koncentracija 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup>. Nakon duljih tretmana, javljaju se morfološka oštećenja i fragmentiranje DNK vidljivo pod mikroskopom.

Stanice su također bile tretirane vodikovim peroksidom kao pozitivnom kontrolom. Međutim, takav tretman uzrokovao je poprilične promjene integriteta staničnih membrana te je došlo do razaranja stanica. Na slici 27 može se vidjeti da nema vidljivog genetičkog materijala stanica te je vjerojatno došlo do apoptoze i nekroze uslijed oštećenja uzrokovanih vodikovim peroksidom.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da THC, bez obzira na korištenu koncentraciju, ne dovodi do značajnijih promjena u dužini repa kometa Caco-2 stanica, bez obzira na duljinu tretmana stanica.

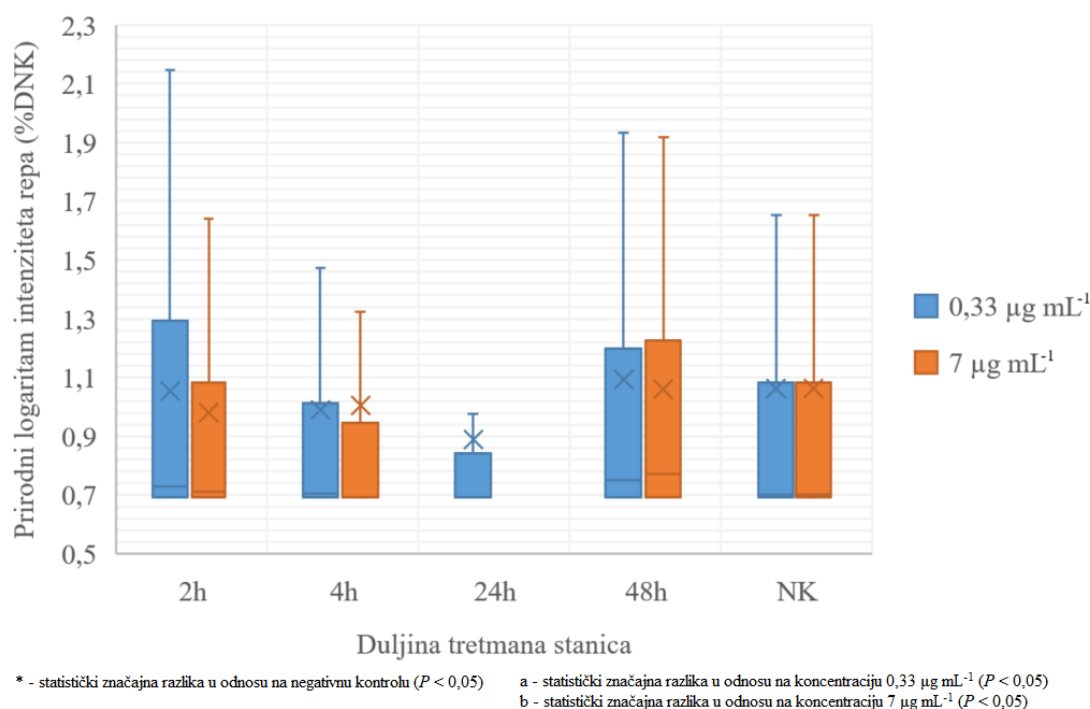


**Slika 27.** Usporedba negativne (lijeva slika) i pozitivne (desna slika) kontrole kometa stanične linije Caco-2

Slika 27 prikazuje izgled kometa stanica Caco-2 netretiranih stanica (negativna kontrola) i stanica tretiranih vodikovim peroksidom (pozitivna kontrola) vidljiv pod mikroskopom. Vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) jedinstven je među općim toksinima. Stabilan je pri abiotičkim uvjetima na sobnoj temperaturi i neutralnom pH, ali ima brz citotoksičan učinak na bilo koju vrstu stanica stvarajući visoko reaktivne hidroksilne radikale (Mahaseth i Kuzminov, 2017). U konačnici, stanice uglavnom umiru procesom apoptoze (Whittemore i sur., 1995) i nekroze.

Iz slikovnog se prikaza jasno vidi razlika u broju prisutnih kometa stanica. Također se može primijetiti da je nakon tretmana pozitivnom kontrolom prisutan „maglasti“ izgled cijelog stakalca što upućuje na to da su stanice bile uništene apoptozom i nekrozom, pa nema vidljivog genetičkog materijala, tj. kometa.

Tretman pozitivnom kontrolom doveo je do značajne citotoksičnosti stanica te nije preostao njihov dovoljan broj za provedbu analize komet testa.



**Slika 28.** Intenzitet repa kometa genetičkog materijala Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Iz slike 28 vidljivo je da ispitivane koncentracije THC-a ne dovode do značajnijih promjena intenziteta repa kometa stanične linije Caco-2. Razlog tomu je što samoj distribuciji THC-a do stanica crijeva prethodi opsežan hepatocelularni metabolizam CYP 450 mikrosomskim sustavom. Kao glavni produkti metabolizma nastaju konjugati glukuronske kiseline čime se povećava topljivost THC-a u vodi i njihova eliminacija (Huestis, 2007).

Povećanje % DNK u repu kometa ovisi o duljini tretmana stanica THC-om. Prema tome, kometi nakon tretmana od 24 i 48 sati nisu izgledali tipično za ovu staničnu liniju, nego su izgledali napuhnuto u odnosu na negativnu kontrolu, ili su pak bili mali i „skvrčeni“, što je vidljivo iz slike 29. Ovo upućuje na zaključak da je nakon duljih tretmana došlo do apoptoze i nekroze stanica uslijed narušavanja integriteta stanične membrane.

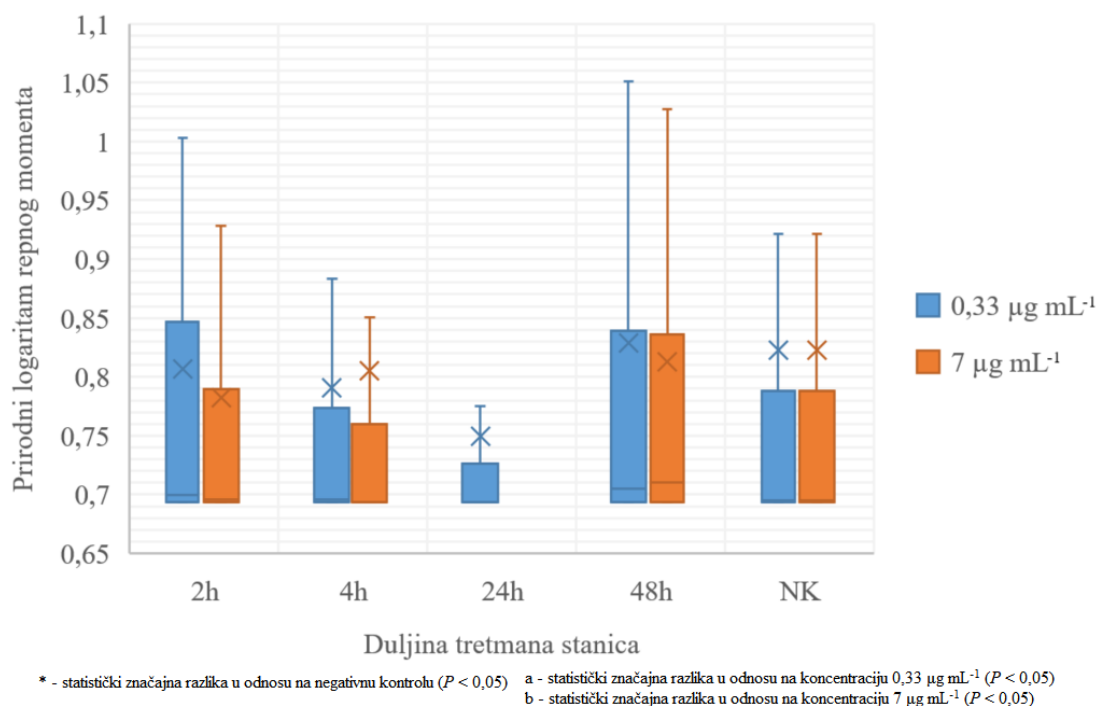
Također, povećanjem koncentracije THC-a dolazi do povećanja njegovog genotoksičnog učinka. To je osobito vidljivo nakon tretmana stanica tijekom 24 sata THC-om koncentracije 7 µg mL<sup>-1</sup>. Došlo je do uništenja genetičkog materijala te kometa nije bilo u dovoljnom broju za provođenje statističke analize (prikazano slikom 30).

Nedavno provedeno *in vivo* istraživanje na štakorima potvrdilo je da kronični unos THC-a uzrokuje genotoksičan učinak. Znanstvenici su ispitali utjecaj THC-a na stanice mozga i na bijele krvne stanice. Štakori su svakodnevno oralno primali dozu od 7 mg kg<sup>-1</sup>

(što odgovara masenoj koncentraciji od  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) u periodu od 7 dana. Rezultate su prikazali nakon 1, 3 i 7 dana tretmana štakora THC-om. Došli su do zaključka da ponovljivo izlaganje THC-u rezultira vremenski ovisnim porastom intenziteta repa u stanicama mozga (Kopjar i sur., 2019).

Iako se radi o drugom tipu stanica, ovim istraživanjem možemo potkrijepiti dobivene rezultate pošto se THC distribuira u različita tkiva nakon što prođe hepatski metabolizam (Abrams i Guzman, 2015). Također je važno spomenuti da se THC primarno eliminira fecesom, a njegov prolazak i enterohepatska recirkulacija dovode do ponovljivog izlaganja stanica debelog crijeva učincima THC-a (Kopjar i sur., 2019).

Zbog malog broja provedenih *in vitro* istraživanja te istraživanja sličnog dizajna, za komentiranje dobivenih rezultata korištene su *in vivo* studije te istraživanja provedena na drugim staničnim linijama i organskim sustavima.

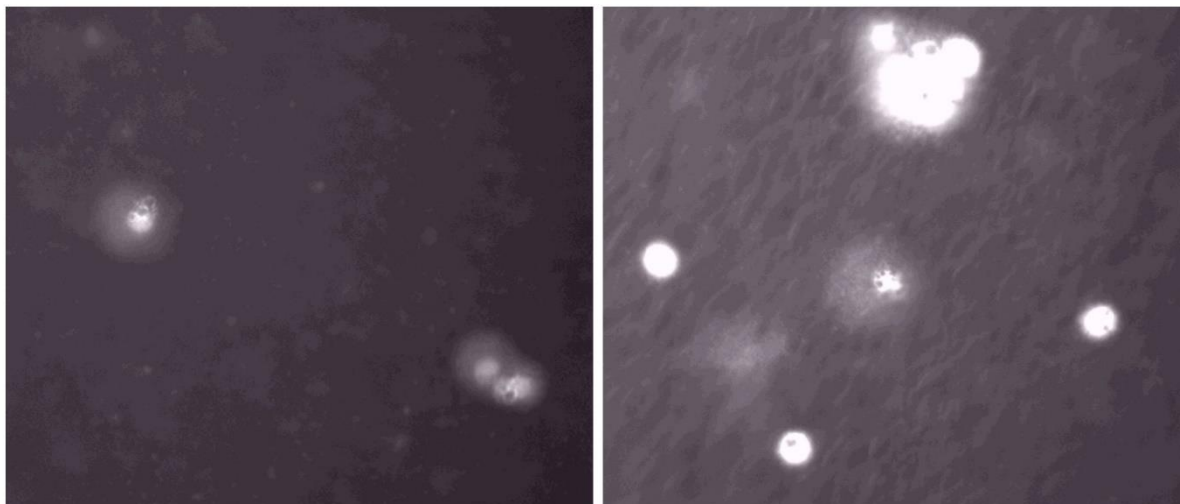


**Slika 29.** Repni moment genetičkog materijala Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a u koncentracijama 0,33 µg mL<sup>-1</sup> i 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju od 2, 4, 24 i 48 sati

Repni moment kometa stanica Caco-2 ovisi o duljini vremena tretmana stanica THC-om. Nakon 48 sati tretmana stanica genotoksični učinak je najizraženiji. To podržava činjenicu da se THC metabolizira crijevima tek nakon što prođe primarni metabolizam jetrom (Abrams i Guzman, 2015). Veća koncentracija THC-a dovodi do većih genotoksičnih učinaka. Nakon tretmana THC-om koncentracije 7 µg mL<sup>-1</sup> u trajanju 24 sata došlo je do značajnog smanjenja broja kometa, a kod genetičkog materijala koji je ostao vidljiv mikroskopom može se uočiti da je došlo do fragmentiranja DNK, što je prikazano slikom 30. Kod tih je stanica vjerojatno došlo do nekroze ili apoptoze. Iz toga možemo izvući zaključak da THC već u koncentraciji od 7 µg mL<sup>-1</sup> djeluje citotoksično i genotoksično na stanice Caco-2, a genotoksičan učinak THC-a proporcionalan je duljini izloženosti stanica.

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da su stanice Caco-2 najotpornije na genotoksične učinke THC-a. To možemo pripisati činjenici da THC unesen oralnim putem ili inhalacijom prvo prolazi metabolizam u jetri, a tek nakon toga slijedi metabolizam u drugim organima i tkivima. Metabolizam THC-a veći je u bolje prokrvljenim organima poput pluća i mozga, a nakon metabolizma nakuplja se u stanicama masnog tkiva te slijedi njegova spora eliminacija, prvenstveno fecesom. U procesu metabolizma, a još više eliminacije THC ima utjecaj na stanice debelog crijeva (Huestis, 2007; Carter i sur., 2004).





**Slika 30.** Kometi stanične linije Caco-2 nakon tretmana otopinom THC-a koncentracije  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  u trajanju 24 sata (lijeva slika) i 48 sati (desna slika).

Iz slike 30 može se uočiti proliferacija stanica nakon duljeg izlaganja višoj koncentraciji THC-a. Međutim, vidi se da kometi nemaju tipičan izgled kao nakon tretmana negativnom kontrolom (slika 27). Već nakon 24 sata tretmana oko glave kometa se javlja „maglasti“ izgled što upućuje na smanjenje količine DNK u jezgri stanica te narušavanje integriteta stanica. Nakon 48 sati tretmana vidljivo je formiranje nakupina genetičkog materijala te specifičan izgleda koji nije tipičan za ovu staničnu liniju. Također je vidljivo veće rasipanje DNK iz glave kometa i fragmentiranje DNK. Ovi podaci upućuju na zaključak da produljenje vremena tretmana dovodi do značajnijih genotoksičnih promjena stanica i nepoželjne proliferacije stanica koje su mutirale.

Najmanje otporna stanična linija na genotoksične učinke THC-a pokazala se linija Hep G2, a razlog tomu je opsežan metabolizam jetrenim enzimima koji prolazi THC te enterohepatička recirkulacija i akumuliranje metabolita THC-a u jetri i masnim stanicama (Abrams i Guzman, 2015; Kopjar i sur., 2019). Kod linije Cal 27 vidljiva je ovisnost genotoksičnog utjecaja THC-a o vremenu izloženosti stanica i koncentraciji THC-a. Stanična linija Caco-2 pokazala se kao najotpornija na genotoksične učinke THC-a. Međutim, s povišenjem koncentracije THC-a i produljenjem vremena tretmana dolazi do sve značajnijih oštećenja DNK.

Rezultati dobiveni provedenim istraživanjem upućuju na to da THC u koncentraciji  $0,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ , koja odgovara koncentraciji THC-a u dronabinolu, lijeku koji se koristi kao suportivna terapija kod osoba koje pate od nuspojava kemoterapije te oboljelih od multiple skleroze, ne djeluje citotoksično na stanične linije Cal 27, Hep G2 i Caco-2 u ispitivanom vremenskom periodu. Međutim, prema *in vivo* istraživanju koje su proveli Parolini i Binelli (2014), postoje naznake da bi dugotrajna izloženost čak i niskoj koncentraciji THC-a mogla imati citotoksičan učinak na stanice. Koncentracija od  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ , koja odgovara letalnoj dozi za štakore, pokazuje izrazit citotoksičan učinak na humane stanične linije Cal 27, Hep G2 te Caco-2. Prema tome možemo zaključiti da se citotoksičan učinak THC-a povećava u ovisnosti o upotrebljenoj koncentraciji.

S obzirom da se THC nakon metabolizma zadržava u masnim stanicama, njegova eliminacija iz organizma je izrazito spora. THC i njegovi metaboliti također se akumuliraju u jetri te prolaze enterohepatičku recirkulaciju uslijed čega dolazi do ponovljivog izlaganja stanica utjecaju THC-a i njegovog produljenog djelovanja na preživljenje stanica.

Stanična linija Caco-2 pokazala se kao najotpornija na citotoksičan učinak THC-a. Međutim, povećanjem koncentracije THC-a i produljenjem duljine tretmana stanica dolazi do smanjenja postotka preživljenja stanica. Koncentracije veće od  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  dovode do očitijeg citotoksičnog učinka THC-a, a do sličnog su zaključka došli i Sarafian i suradnici (2003) te Massi i suradnici (2003).

Prooksidativno djelovanje THC-a raste s vremenom izloženosti stanica i povećanjem upotrebljene koncentracije spoja. Kao najmanje otporna stanična linija pokazala se Cal 27, a Caco-2 stanice su se pokazale kao najotpornije na indukciju slobodnih radikala THC-om. Dobiveni rezultati mogu se povezati sa samim metaboličkim putem THC-a, gdje on ima značajan prvotni učinak već na mjestu administracije, tj. u ustima. Zatim ispoljava prooksidativan učinak na mjestu metabolizma, tj. u jetri, a naposljetku djeluje na najudaljenije stanice, tj. na stanice debelog crijeva.

Genotoksičan učinak THC-a na stanice Cal 27, Hep G2 i Caco-2 vidljiv je već pri koncentraciji od  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , koja se pokazala kao granična koncentracija za citotoksične učinke THC-a. Genotoksičan se učinak povećava kako se produljuje vrijeme izloženosti stanica THC-u. To su također pokazali Kopjar i suradnici (2019) *in vivo* istraživanjem na štakorima. Ponovljivo izlaganje THC-u dovodi do porasta intenziteta repa, a samim time i do porasta oštećenja genetičkog materijala.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Citotoksičan učinak THC-a raste s povećanjem njegove koncentracije te s povećanjem vremena izloženosti stanica otopini THC-a.
2. Ponovljivim izlaganjem THC-u, čak i nižih koncentracija dolazi do povećanja njegovog citotoksičnog učinka na stanice.
3. Prooksidativno djelovanje THC-a raste s vremenom izloženosti stanica i povećanjem upotrebene koncentracije spoja.
4. Genotoksičan učinak THC-a prisutan je već kod koncentracije od  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , koja nije pokazala značajne citotoksične učinke.
5. Genotoksičan se učinak povećava s produljenjem vremena izloženosti stanica THC-u.

## 6. LITERATURA

Abrams, D. I., Guzman, M. (2015) Cannabis in cancer care. *Clin. Pharmacol. Ther.* **97**, 575-586.

Abukhdeir, A. M., Park, B. H. (2008) P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, 3-10.

Adams, I. B., Martin, B. R. (1996) Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. **91**, 1585-1614.

Adelli, G. R., Bhagav, P., Taskar, P., Hingorani, T., Pettaway, S., Gul, W., ElSohly, M. A., Repka, M. A., Majumdar, S. (2017) Development of a  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol amino acid-dicarboxylate prodrug with improved ocular bioavailability. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 2167-2179.

AJCC (American Joint Committee on Cancer) (2010) Colon and rectum. U: *AJCC cancer staging manual*, 7. izd., (Edge, S.B., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A., ured.), Springer, New York, str. 143-159.

Anderson, D., Yu, T.-W., McGregor, D. B. (1998) Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*. **13**, 539-555.

ATCC (2017) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: Hep G2 [HEP G2], <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HB-8065.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 28. kolovoza 2019.

ATCC (2017) American Type Culture Collection. ATCC - The Global Bioresource center: Caco-2 [Caco2], <<https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx#characteristics>>. Pristupljeno 28. kolovoza 2019.

Aviram, J., Samuelly-Leichtag, G. (2017) Efficacy of cannabis-based medicines for pain management: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pain. Physician*. **20**, E755-E796.

Babich, H., Borenfreund, E. (1991) Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the Neutral Red cell viability assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2101-2103.

Bajek, S., Bobinac, D., Jerković, R., Malnar, D., Marić, I. (2007) *Sustavna anatomija čovjeka*, Digital point tiskara d.o.o., Rijeka, str. 140-142.

- Bar-Sela, G., Vorobeichik, M., Drawsheh, S., Omer, A., Goldberg, V., Muller, E. (2013). The medical necessity for medicinal cannabis: prospective, observational study evaluating the treatment in cancer patients on supportive or palliative care. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, 1-8.
- Bates, D. J. P., Lewis, L. D. (2013) Manipulating the apoptotic pathway: potential therapeutics for cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **76**, 381-395.
- Batra, P., Sharma A. K. (2013) Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech.* **3**, 439-459.
- Bergman Marković, B. (2015) Prevencija i rano otkrivanje karcinoma debelog crijeva. *Acta. Med. Croatica.* **69**, 365-371
- Blackard, C., Tennes, K. (1984) Human placental transfer of cannabinoids. *N. Engl. J. Med.* **311**, 797.
- Boyd, M. R., Paull, K. D. (1995) Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev. Res.* **34**, 91-109.
- Boyel, P., Levin, B., (2008) World Cancer Report 2008. IARC - International Agency for Research on Cancer, <<http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2008>>. Pristupljeno 29. kolovoza 2019.
- Brkić, T., Grgić, M. (2006) Kolorektalni karcinom. *Medicus.* **15**, 89-97.
- Brunet, B., Doucet, C., Venisse, N., Hauet, T., Hébrard, W., Papet, Y., Mauco, G., Mura, P. (2006) Validation of large white pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: application to the study of the distribution in tissues. *Forensic. Sci. Int.* **161**, 169-174.
- Bruni, N., Della Pepa, C., Oliaro-Bosso, S., Pessione, E., Gastaldi, D., Dosio, F. (2018) Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. *Molecules*, **23**, 2478.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L. (2010) Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin. Fetal Neonatal. Med.* **15**, 186-190.
- Cairns, R. A., Harris, I. S., Mak, T. W. (2011) Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* **11**, 85-95.
- Carter, G. T., Weydt, P., Kyashna-Tocha, M., Abrams, D. I. (2004) Medicinal cannabis: Rational guidelines for dosing. *Idrugs.* **7**, 464-470.

- Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C., Štětina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. **23**, 143-151.
- Compton, C. C., Greene, F. L. (2004) The Staging of colorectal cancer: 2004 and Beyond. *CA Cancer. J. Clin.* **54**, 295-308.
- Cooper, G. M. (2002) *The Cell - A Molecular Approach*, 2. izd., Sinauer Associates, Sunderland.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2004) *Stanica. Molekularni pristup*, 4. izd., Medicinska naklada, Zagreb, str. 653-79.
- Dehn, P. F., White, C. M., Connors, D. E., Shipkey, G., Cumbo, T. A. (2004) Characterization of the human hepatocellular carcinoma (Hep G2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cell Dev. An.* **40**, 172-182.
- Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A., Cascante, M. (2013) Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **138**, 255-271.
- Dusinska, M., Collins, A. R. (2008) The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*. **23**, 191-205.
- Edinger, A. L., Thompson, C. B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663-669.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B. J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J. C., Pieters, R., Kleiner, J. (2002) Methods of *in vitro* toxicology. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 193-236.
- Freshney, R. I. (2000) Quantitation-cell counting. U: *Culture of animal cells* (Wiley, J., Freshney, R. I., ured.), John Wiley & Sons, Inc., Publication NY, New York.
- Freshney, R. I. (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., Samali, A. (2010) Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, 1-23.
- Gamulin, M., Garaj-Vrhovac, V., Kopjar, N. (2007) Evaluation of DNA damage in radiotherapy-treated cancer patients using the alkaline Comet assay. *Collegium Antropol.* **31**, 837-845.

- Gillet, J. P., Varma, S., Gottesman, M. M. (2013) The clinical relevance of cancer cell lines. *J. Natl. Cancer. Inst.* **105**, 452-458.
- Gilroy, A. M., MacPherson, B. R., Ross, L. M. (2011) *Anatomski atlas. Latinsko nazivlje. Trbuh i zdjelica*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Gioanni, J., Fischel, J.-L., Lambert, J.-C., Demard, F., Mazeau, C., Zanghellini, E., Ettore, F., Formento, P., Chauvel, P., Lalanne, C.-M., Courdi, A. (1988) Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: Establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.*, **24**, 1445-1455.
- Grotenhermen, F. (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.* **42**, 327-360.
- Guzmán, M., Duarte, M. J., Blázquez, C., Ravina, J., Rosa, M. C., Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Velasco, G., González-Feria, L. (2006) A pilot clinical study of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br. J. Cancer.* **95**, 197-203.
- Haghiac, M., Walle, T. (2005) Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr. Cancer.* **53**, 220-231.
- Hall, W., Christie, M., Currow, D. (2005) Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation. *Lancet. Oncol.* **6**, 35-42.
- Harder, S., Rietbrock, S. (1997) Concentration-effect relationship of delta-9-tetrahydrocannabinol and prediction of psychotropic effects after smoking marijuana. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **35**, 155-9.
- Harrison, D. (2001) Adenoma. U: *Encyclopedia of genetics* (Brenner, S., Miller, J. H., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 12.
- Hartman, R. L., Brown, T. L., Milavetz, G., Spurgin, A., Gorelick, D. A., Gaffney, G., Huestis, M. A. (2015) Controlled cannabis vaporizer administration: blood and plasma cannabinoids with and without alcohol. *Clin. Chem.* **61**, 850-869.
- Huestis, M. A. (2007) Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *Chem. Biodivers.* **4**, 1770-1804.
- Husni, A. S., McCurdy, C. R., Radwan, M. M., Ahmed, S. A., Slade, D., Ross, S. A., ElSohly, M. A., Cutler, S. J. (2014) Evaluation of phytocannabinoids from high-potency *Cannabis sativa* using in vitro bioassays to determine structure–activity relationships for cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *Med. Chem. Res.* **23**, 4295-4300.

ISB, Institute for Systems Biology (2013) Dunaliella Cell Counting. <<https://baliga.systemsbiology.net/hs2013/dunaliella>> Pristupljeno 28. kolovoza 2019.

Janković, M., Markotić, A. (2007): Virusi i apoptoza. *Infektološki glasnik*. **27**, 3-70.

Jiang, L., Ji, N., Zhou, Y., Li, J., Liu, X., Wang, Z., Chen, Q., Zeng, X. (2009) CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. *Oral. Oncol.*, **45**, e204-e207.

Juretić, A., Fröbe, A., Đaković, N., Marić Brozić, J., Šantek, F., Beketić-Orešković, L. (2017) Colorectal cancer treatment: an introduction. *Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti*. **44**, 47-54.

Klumpers, L. E., Thacker, D. L. (2019) A brief background on cannabis: from plant to medical indications. *J. AOAC Int.* **102**, 412-420.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina-Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **56**, 195-204.

Kopjar, N., Fuchs, N., Žunec, S., Mikolić, A., Micek, V., Kozina, G., Lucić Vrdoljak, A., Brčić Karačonji, I. (2019) DNA Damaging Effects, Oxidative Stress Responses and Cholinesterase Activity in Blood and Brain of Wistar Rats Exposed to  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol. *Molecules*. **24**, 1560.

Krešić, V. (2009) *Centralna jedinica za pripremu citostatske i intravenozne terapije-standardi kvalitete*. Stručni rad, Sestrinski glasnik.

Lea T. (2015) Caco-2 Cell Line. U: *The Impact of Food Bioactives on Health* (Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., ured.), Springer, Cham, str. 103-111.

Lee, J.C., Son, Y.O., Pratheeshkumar, P., Shi, X. (2012) Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 742-57.

Lemberger, L., Tamarkin, N. R., Axelrod, J., Kopin, I. J. (1971) Delta-9-tetrahydrocannabinol: metabolism and disposition in long-term marihuana smokers. *Science*. **173**, 72-74.

Li, S., Yan, T., Yang, J. Q., Oberley, T. D., Oberley, L. W. (2000) The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* **60**, 3927-3939.



- Loeb, L. A., Harris, C. C. (2008) Advances in chemical carcinogenesis: A historical Review and perspective. *Cancer. res.* **68**, 6863-6872.
- Lucić Vrdoljak, A., Fuchs, N., Mikolić, A., Žunec, S., Brčić Karačonji, I., Jurić, A., Prester, Lj., Micek, V., Neuberg, M., Čanović, S., Mršić, G., Kopjar, N. (2018). Irinotecan and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol interactions in rat liver: a preliminary evaluation using biochemical and genotoxicity markers. *Molecules*, **23**, 1332.
- Magalhães, B., Peleteiro, B., Lunet, N. (2012) Dietary patterns and colorectal cancer. *Eur. J. Cancer. Prev.* **21**, 15–23.
- Mahaseth, T., Kuzminov, A. (2017) Potentiation of hydrogen toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutat. Res. – Rev. Mutat.* **773**, 274-281.
- Martín-Banderas, L., Muñoz-Rubio, I., Prados, J., Álvarez-Fuentes, J., Calderón-Montaña, J. M., López-Lázaro, M., Arias, J. L., Leiva, M. C., Holgado, M. A., Fernández-Arévalo, M. (2015) In vitro and in vivo evaluation of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol/PLGA nanoparticles for cancer chemotherapy. *Int. J. Pharm.*, **487**, 205-212.
- Marzo, V. D., Bifulco, M., Petrocellis, L. D. (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 771-784.
- Massi, P., Vaccani, A., Ceruti, S., Colombo, A., Abbracchio, M. P., Parolaro, D. (2003) Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 838-845.
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X.J., Darroudi, F., Kassie, F. (2004) Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. **198**, 329-340.
- Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y., Fabre, G. (1995) The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol. Toxicol.* **11**, 187-194.
- Munson, A. E., Harris, L. S., Friedman, M. A., Dewey, W. L., Carchman, R. A. (1975) Antineoplastic activity of cannabinoids. *J. Natl. Cancer. Inst.* **55**, 597-602.
- Muto, T., Bussey, H. J., Morson, B. C. (1975) The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. **36**, 2251-2270.

- Nelson, H., Petrelli, N., Carlin, A., Couture, J., Fleshman, J., Guillem, J., Miedema, B., Ota, D., Sargent, D. (2001) Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J. Natl. Cancer. Inst.* **93**, 583-596.
- Nugent, S. M., Morasco, B. J., O'Neil, M. E., Freeman, M., Low, A., Kondo, K., Elven, C., Zakher, B., Motu'apuaka, M., Paynter, R., Kansagara, D. (2017) The effects of cannabis among adults with chronic pain and an overview of general harms. *Ann. Intern. Med.* **167**, 319-331.
- Oh, D. A., Parikh, N., Khurana, V., Smith, C. C., Vetticaden, S. (2017) Effect of food on the pharmacokinetics of dronabinol oral solution versus dronabinol capsules in healthy volunteers. *Clin. Pharmacol.* **9**, 9-17
- Ohlsson, A., Lindgren, J.-E., Wahlen A., Agurell, S. (1982) Single dose kinetics of deuterium labelled  $\Delta^1$  - tetrahydrocannabinol in heavy and light cannabis users. *Biol. Mass Spectrom.* **9**, 6-10.
- Pacifici, R., Marchei, E., Salvatore, F., Guandalini, L., Busardò, F. P., Pichini, S. (2018) Evaluation of long-term stability of cannabinoids in standardized preparations of cannabis flowering tops and cannabis oil by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* **56**, 94-96.
- Pandurangan, A. K., Divya, T., Kumar, K., Dineshbabu, V., Velavan, B., Sudhandiran, G. (2018) Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. *World. J. Gastrointest. Oncol.* **10**, 244-259.
- Parolini, M., Binelli, A. (2014) Oxidative and genetic responses induced by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) to *Dreissena polymorpha*. *Sci. Total. Environ.* **468-469**, 68-76.
- Patsos, H. A., Hicks, D. J., Greenhough, A., Williams, A. C., Paraskeva, C. (2005) Cannabinoids and cancer: potential for colorectal cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 712-714.
- Pećina-Šlaus, N., Bulić-Jakuš, F., Radić, K. (2005) Tumor supresorski geni. *Medicinar.* **46**, 44-47.
- Pinto, C. E., Moura, E., Serrão, M. P., Martins, M. J., Vieira-Coelho, M. A. (2010) Effect of (-)- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinoid on the hepatic redox state of mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **43**, 325-329.

- Quintas, A. (2019) Should we legalize marijuana? Ten years of learning from JWH-018 first seizure. *Ann. Med.* **51**, 178-178.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. protoc.* **3**, 1125-1131.
- Roche Diagnostics GmbH (2012) Culture of animal cells - Basic Techniques.
- Rog, D. J., Nurmikko, T. J., Friede, T., Young, C. A. (2005) Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology.* **65**, 812-819.
- Rosenkrantz, H., Heyman, I. A., Braude, M. C. (1974) Inhalation, parenteral and oral LD50 values of  $\Delta^9$  - tetrahydrocannabinol in Fischer rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **28**, 18-27.
- Rossmann, M. J., Groot, H. J., Reese, V., Zhao, J., Amann, M., Richardson, R. S. (2013) Oxidative stress and COPD: The impact of oral antioxidants on skeletal muscle fatigue. *Med. Sci. Sports Exerc.* **45**, 1235-1243.
- Roth, A., Roth, A. (2001) Rak debelog crijeva. *Medicus.* **10**, 191-199.
- Russo, E. B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid - terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1344-1364.
- Salopek-Sondi, B., Piljac-Žegarac, J., Magnus, V., Kopjar, N. (2010) Free radical–scavenging activity and DNA damaging potential of auxins IAA and 2-methyl-IAA evaluated in human neutrophils by the alkaline comet assay. *J. Biochem. Mol. Toxic.* **24**, 165-173.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco, F. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* **21**, 1-26.
- Sarafian, T. A., Kouyoumjian, S., Khoshaghideh, F., Tashkin, D. P., Roth, M. D. (2003)  $\Delta^9$  - Tetrahydrocannabinol disrupts mitochondrial function and cell energetics. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **284**, L298–L306.
- Savill, J. (1994) Apoptosis and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**, 12-21.
- Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., Afaq, F., Mukhtar H. (2008) Cannabinoids for cancer treatment: Progress and promise. *Cancer. Res.* **68**, 339-342.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., Gey, G. O. (1953) studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial

cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**, 695-710

Schimrigk, S., Marziniak, M., Neubauer, C., Kugler, E. M., Werner, G., Abramov-Sommariva, D. (2017) Dronabinol is a safe long-term treatment option for neuropathic pain patients. *Eur. Neurol.* **78**, 320-329.

Scott, K. A., Dalglish, A., G., Liu, W. M. (2017) Anticancer effects of phytocannabinoids used with chemotherapy in leukaemia cells can be improved by altering the sequence of their administration. *Int. J. Oncol.* **51**, 369-377.

Seregini, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Bombardieri, E. (2001) Diagnostic and prognostic tumor markers in the gastrointestinal tract. *Semin. Surg. Oncol.* **20**, 147-166.

Sharma, P., Murthy, P., Bharath, M. M. S. (2012) Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: Clinical implications. *Iran. J. Psychiatry.* **7**, 149-156.

Sharma, S. V., Haber, D. A., Settleman, J. (2010) Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer.* **10**, 241-253.

Sherr, C. J. (1996) Cancer cell cycles. *Science.* **274**, 1672-1677.

Shewach, D. S., Kuchta, R. D. (2009) Introduction to Cancer Chemotherapeutics. *Chem. Rev.* **109**, 2859-2861.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **175**, 184-191.

Silveira, L. R., Pereira da Silva, L., Juel, C., Hellsten, Y. (2003) Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. *Free Radical Bio. Med.* **35**, 455-464.

Skopp, G., Stroheck-Kuehner, P., Mann, K., Hermann, D. (2007) Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis. *Forensic. Sci. Int.* **170**, 46-50.

Šekerija, M. (2019) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2016., Bilten 41, Zagreb.

Štimac, D., Katičić, M., Kujundžić, M., Ljubičić, N., Poropat, G., Bokun, T. (2008) Značaj ranog otkrivanja raka debelog crijeva. *Medicina.* **44**, 7-15.

Štraus, B. (1995) Genomske promjene i karcinogeneza. *Biochem. Med.* **5**, 11-21.

Thurston, D. E. (2007) *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, Taylor and Francis Group, Boca Raton.

Tice, R. R., Aquarell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**, 206-221.

Toxys, *In vitro* comet assay. <<https://toxys.com/services/genetic-toxicology-assays/in-vitro-comet-assay/>> Pristupljeno: 4.9.2019.

Turner, S. E., Williams, C. M., Iversen, L., Whalley, B. J. (2017) Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. U: *Phytocannabinoids. Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa* (Kingham, A. D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J., ured.), Springer, Cham, str. 62-71.

UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime (2019) *World Drug Report 2019*. United Nations publication, Beč.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* **266**, 37-56.

Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuca, K., Mulisek, K. (2016) Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch. Toxicol.* **90**, 1-37.

Vrdoljak, E., Pleština, S., Omrčen, T., Juretić, A., Belac Lovasić, I., Krznarić, Ž., Flam, J., Šobat, H., Šeparović, R., Bolanča, A., Vojnović, Ž., Boban, M., Perko, Z., Patrlj, L., Zelić, M., Gašparov, S., Tomaš, I., Cambj Sapunar, L., Miletić, D., Štimac, D. (2018) Smjernice za dijagnosticiranje, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka debelog crijeva. *Liječ. Vjesn.* **140**, 241–247

Wang, H., Joseph, J.A. (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio. Med.* **27**, 612-616.

Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., Keurentjes, J. C., Lang, S., Misso, K., Ryder, S., Schmidtkofer, S., Westwood, M., Kleijnen, J. (2015) Cannabinoids for medical use. *JAMA.* **313**, 2456-2473.

Whittemore, E. R., Loo, D. T., Watt, J. A., Cotman, C. W. (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience.* **67**, 921-932.

Zuurman, L., Ippel, A. E., Moin, E., van Gerven, J. M. (2009) Biomarkers for the effects of cannabis and THC in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **67**, 5-21.

Žlender, V. (2003) Apoptoza – programirana smrt stanice. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **54**, 267-274.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Sara Stožek

Ime i prezime studenta